

Architektur und Funktion eubakterieller Dodecine

**- eine neuartige Proteinfamilie Kofaktor-speichernder
Proteine**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem

Fachbereich Chemie der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Britta Meißner

aus Wolfhagen

Marburg a. d. Lahn 2014

Originaldokument gespeichert auf dem Publikationsserver der
Philipps-Universität Marburg
<http://archiv.ub.uni-marburg.de>



Dieses Werk bzw. Inhalt steht unter einer
Creative Commons
Namensnennung
Keine kommerzielle Nutzung
Weitergabe unter gleichen Bedingungen
3.0 Deutschland Lizenz.

Die vollständige Lizenz finden Sie unter:
<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/de/>

Vom Fachbereich Chemie
der Philipps-Universität Marburg (Hochschulkennziffer 1180)
als Dissertation angenommen am 10.03.2015

Erstgutachter: Prof. Dr. Lars-Oliver Essen
Zweitgutachter: Prof. Dr. Andreas Heine

Tag der mündlichen Prüfung: 13.3.2015

Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation mit dem Thema:

**„Architektur und Funktion eubakterieller Dodecine – eine neuartige Proteinfamilie
Kofaktor-speichernder Proteine“**

selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als den von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder in einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule anlässlich eines Promotionsgesuchs oder zu anderen Prüfungszwecken eingereicht.

Ort, Datum

Britta Meißner

Im Verlauf der Promotion veröffentlichte Publikationen:

Meissner, B; Schleicher E.; Weber, S., Essen LO.,

The dodecin from *Thermus thermophilus*, a bifunctional cofactor storage protein.

J Biol Chem 2007 Nov 9; 282 (45): 33142-54

Vinzenz X., Grosse W., Linne U., Meissner, B., Essen LO.,

Chemical engineering of *Mycobacterium tuberculosis* dodecin hybrids.

Chem Comm (Camb), 2011 Oct 21; 47(39):11071-3

Zusammenfassung

Dodecine sind kleine Flavin-bindende Proteine, die während eines inversen Strukturgenomik-Projektes im Archaeobakterium *H. salinarum* entdeckt worden sind. Die nur 7.4 kDa großen monomeren Untereinheiten mit einfachem $\beta\alpha\beta$ -Faltungsmotiv bilden dodecamere Komplexe mit kubischer 23-Punktsymmetrie, die einen inneren Hohlraum aufweisen. Die Flavine werden in Form von Dimeren in Bindungstaschen entlang der zweizähligen Achsen des Komplexes gebunden und bilden mit zwei benachbarten Tryptophanresten eine bislang einzigartige aromatische Tetrade.

Diese Arbeit legt einen Grundstein für das Verständnis der Flavinbindung in eubakteriellen Dodecinen. Durch das Lösen der 2.6 und 1.7 Å Kristallstrukturen der heterolog exprimierten Dodecine aus *T. thermophilus* und *M. tuberculosis* konnte gezeigt werden, dass eubakterielle Dodecine einen anderen Bindungsmodus aufweisen, als zuvor für das haloarchaeale Dodecin publiziert. Einzelne Punktmutationen der Reste, in denen sich eubakterielle Dodecine von dem archaeobakteriellen Typus unterscheiden, weisen jedoch denselben Bindungsmodus auf wie der Wildtyp, wie durch Lösen der 2.6 und 1.3 Å Kristallstrukturen der *T. thermophilus* Dodecin R45A- und R65A-Mutanten gezeigt werden konnte. Spektroskopische Untersuchungen des *T. thermophilus* WT-Proteins und seiner W38Y- und W38F-Mutanten zur Charakterisierung der Funktion der aromatischen Tetrade geben deutliche Hinweise auf elektronische Interaktionen zwischen Flavin und der benachbarten aromatischen Aminosäure, die letztendlich im Falle des WT Dodecins innerhalb von nur 70 fs zur kompletten Deaktivierung des angeregten Flavinzustandes führt.

Neben Flavin-Dimeren enthalten eubakterielle Dodecine endogen gebundenes Coenzym A wie durch Röntgenkristallographie und massenspektrometrische Untersuchungen nachgewiesen werden konnte. Die CoA-Moleküle sind in den dreizähligen symmetrischen Stellen II als Trimere nicht-kovalent so gebunden, dass die freie Thiol-Gruppe von Protein umgeben ist. Eine solche trimere Anordnung von CoA ist bis jetzt – ebenso wie die des FMN-Kofaktors – einzigartig und ein Kennzeichen eubakterieller Dodecine.

Erstmals konnte zudem ein Dodecin-Datensatz in atomarer Auflösung (1.08 Å) aufgenommen werden, der als Grundlage für zukünftige Berechnungen der Dodecin-Kofaktor-Interaktionen herangezogen werden kann.

Aufgrund der gewonnenen Erkenntnisse kann die Funktion des Dodecins als bifunktionales Speicherprotein postuliert werden, das sowohl CoA als auch Flavine in nicht-reaktiver Form speichert und somit die zelluläre Photoschädigung aufgrund dieser Kofaktoren reduziert.

Summary

Dodecins are small flavin binding proteins, which were discovered during an inverse structural genomics project in the archaeobacterium *H. salinarum*. The monomeric subunits, which are only 7.4 kDa in size consist of a simple $\beta\alpha\beta\beta$ fold and adopt a hollow spheric dodecameric complex with cubic 23-point symmetry. The flavins are bound as dimers along the twofold symmetry axes of the dodecameric complex and are sandwiched between two neighbouring tryptophan residues resulting in an aromatic tetrad, which is unique so far.

This work is the basis for the understanding of flavin binding in eubacterial dodecins. Solving the 2.6 and 1.7 Å crystal structures of the heterologously expressed dodecins from *T. thermophilus* and *M. tuberculosis* showed a different flavin-binding mode for eubacterial dodecins than published for the *H. salinarum* dodecin. Single point mutations of residues, which differ in the eubacterial dodecins and the haloarchaeal type showed the same binding mode as observed for the wild type *T. thermophilus* dodecin, as was shown by the 2.6 and 1.3 Å crystal structures of the *T. thermophilus* dodecin R45A and R65A mutants. Spectroscopic investigation of the *T. thermophilus* dodecin and its W38Y and W38F mutants which were performed in order to investigate the function of the aromatic tetrad give clear indication of electronic interaction between the flavin and its neighbouring amino acid, which results in case of the WT dodecin in complete deactivation of the flavin activated state in only 70 fs.

Beside flavin dimers eubacterial dodecins also contain endogenously bound coenzyme A, as was shown by X-ray crystallography and mass spectrometry. The CoA molecules are bound non-covalently as trimers in the threefold symmetric face II in such a way that the free thiol group is surrounded by the protein. Such a trimeric assembly of CoA molecules has never been reported in literature before.

Also for the first time a dodecin dataset with atomic resolution (1.08 Å) was collected, that can serve as a basis for further calculations of dodecin-flavin interactions.

Based on the obtained knowledge the function of dodecin as bifunctional cofactor storage protein can be postulated; this protein binds CoA and flavins in a non-reactive state and reduces cellular photosensitive effects resulting from these cofactors.

Für Patrick

1	Einleitung	1
1.1	Biologische Funktion der Flavine	1
1.2	Photochemische Eigenschaften der Flavine	3
1.2.1	Flavine als Photosensitizer	4
1.2.2	Photodegradation von Flavinen	5
1.3	Flavoproteine	6
1.4	Coenzym A-bindende Proteine	11
1.5	Dodecamere Proteinkomplexe	12
1.6	Dodecine	18
1.6.1	Die Struktur des <i>H. salinarum</i> Dodecins	18
1.6.2	Vorkommen und Funktion von Dodecinen	20
1.7	Motivation und Zielsetzung	21
2	Material und Methoden	23
2.1	Materialien	23
2.1.1	Geräte	23
2.1.2	Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterialien	25
2.1.3	Vektoren	28
2.1.3.1	pET-28a(+)	28
2.1.3.2	pEX18Ap	29
2.1.4	Biologisches Material	29
2.1.4.1	<i>E. coli</i> DH5 α	29
2.1.4.2	<i>E. coli</i> XL1-Blue Superkompetente Zellen	30
2.1.4.3	<i>E. coli</i> BL21-Gold(DE3)	30
2.1.5	Primer	31
2.1.6	Medien	31
2.1.7	Antibiotika-Stammlösungen	33
2.1.8	Puffer	34
2.2	Molekularbiologische Methoden	35
2.2.1	PCR	35
2.2.2	DNA-Präparation aus PCR-Ansätzen	37
2.2.3	Hydrolytische Spaltung mit Restriktionsendonukleasen	37
2.2.4	Hitzeinaktivierung	38
2.2.5	CIP-Verdau	38
2.2.6	Agarosegelelektrophorese	38

2.2.7	Isolierung und Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	39
2.2.8	Ligation von DNA-Fragmenten	40
2.2.9	Entsalzung des Ligationsansatzes	40
2.2.10	Transformation	40
2.2.10.1	Chemische Transformation	40
2.2.10.2	Elektroporation.....	41
2.2.11	Ortsspezifische Mutagenese	41
2.2.12	Plasmidpräparation.....	43
2.2.12.1	Mini-Plasmidpräparation unter Verwendung von Silicagel-Säulchen.....	43
2.2.12.2	Mini-Plasmidpräparation mit anschließender Alkoholpräzipitation (<i>quick-and-dirty</i>)	43
2.2.12.3	Midi-Plasmidpräparation.....	44
2.2.13	Präparation genomischer DNA	45
2.2.14	Verdau der genomischen DNA	46
2.2.15	NaAc/EtOH-Fällung des Verdau mit anschließender Elektrophorese	46
2.2.16	Southern-Blot	46
2.2.17	DNA-Konzentrationsbestimmung.....	49
2.2.17.1	Photometrische DNA-Konzentrationsbestimmung.....	49
2.2.17.2	DNA-Konzentrationsbestimmung anhand von Agarosegelen	50
2.2.18	Sequenzierung	50
2.2.19	Stammhaltung.....	51
2.3	Mikrobiologische Methoden	51
2.3.1	Phänotypencharakterisierung	51
2.3.1.1	Wachstumskurven unter aeroben Bedingungen.....	51
2.3.1.2	Wachstumskurven unter anaeroben Bedingungen	51
2.3.1.3	Wachstumskurven unter NO-Stress	51
2.3.1.4	Wachstumskurven und Bestimmung der Lebendzellzahl nach Inkubation in Tryptophan- bzw. Riboflavin-haltigem Medium	52
2.3.1.5	Überleben in anaerober Stationärphase.....	52
2.3.1.6	Bestimmung der Lebendzellzahl nach Peroxid-Stress	52
2.3.1.7	Bestimmung der Lebendzellzahl nach UV-Stress.....	53
2.3.1.8	Bestimmung der Lebendzellzahl nach Hitzeschock.....	53
2.3.1.9	Bestimmung des Hemmhofradius‘ nach Peroxid- oder Paraquat-Stress	54
2.3.2	Pathogenizitätstest	54

2.4	Proteinchemische Methoden	54
2.4.1	Produktion von rekombinantem Protein	54
2.4.1.1	Testexpression.....	55
2.4.1.2	Expression in präparativem Maßstab	55
2.4.2	Zellaufschluss.....	55
2.4.2.1	Testaufschluss	55
2.4.2.2	Präparativer Aufschluss.....	56
2.4.3	Hitzenaturierung	56
2.4.4	Chromatographische Methoden	56
2.4.4.1	Anionenaustauscher	57
2.4.4.2	Größenausschlusschromatographie.....	57
2.4.4.3	Entsalzung mittels PD-10-Säule.....	58
2.4.5	Ultrafiltration.....	58
2.4.6	Dialyse.....	58
2.4.7	Deflaviniierung.....	58
2.4.7.1	Präparation von apo-Protein durch Dialyse	59
2.4.7.2	Präparation von apo-Protein mittels TCA-Fällung	59
2.5	Analytische Methoden.....	60
2.5.1	SDS-PAGE.....	60
2.5.2	Bradford-Assay	62
2.5.3	BCA-Assay.....	62
2.5.4	Bestimmung von Kofaktorkonzentrationen	63
2.5.5	Ellman-Assay	63
2.5.6	HPLC-ESI-MS	64
2.5.7	Absorptionsspektroskopie	65
2.5.8	Bestimmung von Extinktionskoeffizienten.....	65
2.5.9	Fluoreszenzspektroskopie	66
2.5.9.1	Fluoreszenzemissionsspektren	66
2.5.9.2	Fluoreszenztitration.....	66
2.5.9.3	Fluoreszenztitration durch manuelles Pipettieren	67
2.5.9.4	Fluoreszenztitration durch Verwendung einer Titrationseinheit.....	67
2.5.9.5	Fluoreszenztitration zur Bestimmung der Zeitabhängigkeit	68
2.5.10	Isothermale Titrationskalorimetrie	69
2.5.11	CD-Spektroskopie	70

2.5.12	Reduktion	70
2.5.12.1	Reduktion mit Natriumdithionit	70
2.5.12.2	Photoreduktion	71
2.5.12.3	Reduktion mit Titan(III)citrat.....	71
2.5.12.4	Reduktion durch Röntgenstrahlung.....	72
2.5.13	EPR-Spektroskopie	72
2.6	Proteinkristallisation.....	74
2.6.1	Screening	75
2.6.2	Optimierung	75
2.6.3	Inkubation, Beobachtung und Dokumentation.....	76
2.6.4	Austesten von Cryobedingungen	76
2.6.5	Datensammlung und Datenreduktion.....	77
2.6.6	Strukturlösung und Verfeinerung	78
2.6.7	Graphische Darstellungen	79
3	Ergebnisse	81
3.1	Charakterisierung des Dodecins aus <i>T. thermophilus</i>	84
3.1.1	Klonierung des <i>T. thermophilus</i> Dodecingens und seiner Mutanten	84
3.1.1.1	Klonierung des Gens für das <i>T. thermophilus</i> Dodecin und seiner Mutanten	84
3.1.2	Expression und Aufreinigung.....	84
3.1.2.1	Expression der <i>T. thermophilus</i> Dodecin Mutanten.....	84
3.1.2.2	Aufreinigung der <i>T. thermophilus</i> Dodecin Mutanten	85
3.1.2.3	Rückfaltung des <i>T. thermophilus</i> Wildtyp Dodecins	87
3.1.2.4	Präparation von Riboflavin- und FAD-haltigem <i>T. thermophilus</i> Dodecin.....	89
3.1.2.5	Bestimmung des Molekulargewichtes durch Massenspektrometrie	89
3.1.3	Kofaktorbindung und Oligomerisierung von Dodecinen.....	90
3.1.3.1	Qualitative Bestimmung der Kofaktoren durch Massenspektrometrie	90
3.1.3.2	Quantitative Bestimmung von CoA mittels des Ellman Assays	91
3.1.3.3	Bestimmung Protein-gebundener Flavin-Extinktionskoeffizienten.....	91
3.1.3.4	CD-Spektroskopie	91
3.1.4	Spektroskopische Charakterisierung des Dodecin-Flavin-Komplexes	94
3.1.4.1	Absorptionsspektroskopie	94
3.1.4.2	Fluoreszenzemissionsspektren	95
3.1.5	Spezifität und Zeitabhängigkeit der Bindung von Flavinen an das <i>T. thermophilus</i> Dodecin	96

3.1.5.1	Bestimmung der Dissoziationskonstanten durch Fluoreszenztitration	96
3.1.5.2	Bestimmung der Dissoziationskonstante für FMN durch Isothermale Titrationskalorimetrie.....	101
3.1.6	Redoxchemie des <i>T. thermophilus</i> Dodecins	103
3.1.6.1	Chemische Reduktion des <i>T. thermophilus</i> Wildtyp Dodecins.....	103
3.1.6.2	Magnetische Resonanz-Spektroskopie des chemisch reduzierten <i>T. thermophilus</i> Wildtyp Dodecins	104
3.1.6.3	Zeitaufgelöste EPR-Spektroskopie des <i>T. thermophilus</i> Dodecins.....	106
3.1.6.4	Reduktion der <i>T. thermophilus</i> Dodecin W38F-Mutante durch Röntgenstrahlung	107
3.1.7	Strukturbestimmung des <i>T. thermophilus</i> Dodecins	108
3.1.7.1	Kristallisation des <i>T. thermophilus</i> Dodecins	109
3.1.7.2	Datensammlung, Strukturlösung und Verfeinerung des <i>T. thermophilus</i> Dodecins.....	114
3.2	Charakterisierung des <i>Mycobacterium tuberculosis</i> Dodecins	119
3.2.1	Klonierung des <i>M. tuberculosis</i> Dodecingens.....	119
3.2.2	Expression und Aufreinigung des <i>M. tuberculosis</i> Dodecins	119
3.2.2.1	Expression des <i>M. tuberculosis</i> Dodecins.....	119
3.2.2.2	Aufreinigung des <i>M. tuberculosis</i> Dodecins	120
3.2.2.3	Bestimmung des Molekulargewichtes durch Massenspektrometrie	123
3.2.3	Kofaktorbindung und Oligomerisierung des dodecameren <i>M. tuberculosis</i> Dodecinkomplexes	124
3.2.3.1	Bestimmung des apparenten Molekulargewichtes durch Gelfiltration.....	124
3.2.3.2	Bestimmung der endogen im <i>M. tuberculosis</i> Dodecin gebundenen Kofaktoren..	124
3.2.3.3	Bestimmung des Dodecin-gebundenen Flavin-Extinktionskoeffizienten.....	124
3.2.4	Spektroskopische Charakterisierung des <i>M. tuberculosis</i> Dodecin-Flavin- Komplexes.....	125
3.2.4.1	Absorptionsspektroskopie	125
3.2.4.2	CD-Spektroskopie	125
3.2.5	Strukturbestimmung des <i>M. tuberculosis</i> Dodecins.....	126
3.2.5.1	Kristallisation des <i>M. tuberculosis</i> Dodecins.....	127
3.2.5.2	Datensammlung, Strukturlösung und Verfeinerung des <i>M. tuberculosis</i> Dodecins.....	131
3.3	Charakterisierung des <i>Streptomyces coelicolor</i> Dodecins	135

3.3.1	Klonierung des <i>S. coelicolor</i> Dodecingens	135
3.3.2	Testexpression und Löslichkeitsverhalten des <i>S. coelicolor</i> Dodecins.....	135
3.4	Charakterisierung des <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Dodecins	137
3.4.1	Klonierung des <i>P. aeruginosa</i> Dodecingens	137
3.4.2	Testexpressionen und Löslichkeitstests des <i>P. aeruginosa</i> Dodecins.....	137
3.5	Charakterisierung der <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Dodecin-Knockout-Mutante	139
3.5.1	Klonierung des <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Dodecin-Knockout-Vektors pΔdodecin.....	140
3.5.2	Deletion des Dodecingens	142
3.5.3	Phänotypenscreening.....	142
3.5.4	Pathogenizitätstest	148
4	Diskussion	151
4.1	Dodecine – Vorkommen und Klassifizierung.....	151
4.2	Die Struktur des dodecameren Komplexes	154
4.2.1	Die Monomerfaltung	156
4.2.2	Die Stabilisierung der Quartärstruktur	159
4.3	Die Flavinbindung.....	163
4.3.1	Die Identifizierung des gebundenen Flavinkofaktors	163
4.3.2	Die Flavinbindung in eubakteriellen W-Typ Dodecinen	164
4.3.3	Vergleich zwischen eubakterieller und archaebakterieller Flavinbindung	166
4.3.4	Spektroskopische und Redox-Eigenschaften der Flavinbindung.....	169
4.3.5	Spezifität und Zeitabhängigkeit der Flavinbindung	171
4.4	Die CoA-Bindung in eubakteriellen Dodecinen	173
4.5	Die biologische Funktion	178
4.6	Anwendungen.....	180
4.6.1	Dodecine als <i>Crystallization tags</i>	180
4.6.2	Dodecin-Biohybride als schaltbare Katalysatoren	182
4.6.3	Dodecine als Blaulicht-gesteuerte molekulare Käfige.....	184
4.6.4	Dodecine als molekulare Schalter	186
4.7	Abschließende Bemerkung	187
5	Anhang	189
5.1	Abkürzungen	189
5.2	Aminosäuren	192
5.3	Strukturformeln von Flavinen und CoA.....	193

5.4	Dodecindaten.....	194
5.5	Oligonukleotide.....	195
5.6	Massenspektrum zum Nachweis der Bindung von CoA im <i>M. tuberculosis</i> Dodecin	198
5.7	Verwendete Kristallisationsscreens.....	199
5.7.1	Sigma Basic.....	199
5.7.2	Sigma Extension.....	200
5.7.3	Sigma Cryo.....	201
5.7.4	Nextal Classic.....	202
5.7.5	Nextal Classic Lite	203
5.7.6	Nextal Anions.....	205
5.8	Informationen zu den gesammelten Datensätzen.....	208
5.9	Aminosäurezusammensetzung der Dodecine.....	210
6	Literatur	211

1 Einleitung

1.1 Biologische Funktion der Flavine

Die Flavine sind die am weitesten verbreiteten Kofaktoren von Proteinen; als solche nehmen sie an einer großen Bandbreite an katalytischen und sensorischen Reaktionen teil, angefangen von typischen Redoxreaktionen über die Aktivierung von Sauerstoff bis hin zur Photochemie. Eine Übersicht über die biologischen Funktionen von Flavoproteinen gibt Abb. 1.

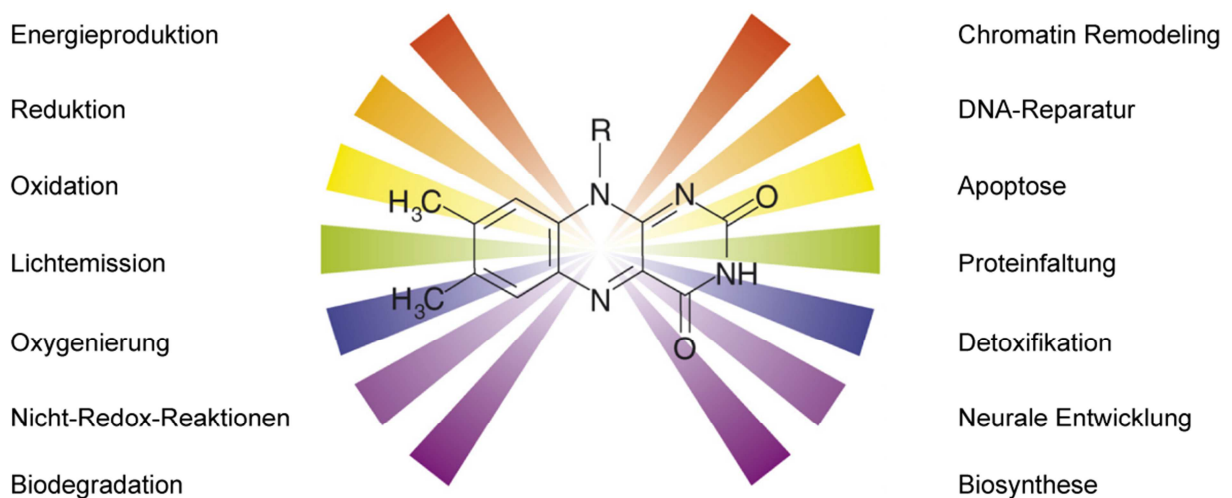


Abb. 1: Biologische Funktionen von Flavoenzymen (entnommen aus [1])

Beteiligt an diesen Prozessen sind die Flavine FMN (Flavinmononukleotid) und FAD (Flavinadenindinukleotid), die als Kofaktoren in Flavoproteinen in zumeist nicht-kovalent gebundener Form vorliegen, während Riboflavin (Vitamin B₂) ausschließlich als biosynthetische Vorstufe dient (Strukturformeln siehe Anhang 5.3). Zahlreiche Bakterien, Hefen, Pilze und Pflanzen können Riboflavin aus GTP und Ribulose-5-Phosphat synthetisieren, während höhere Lebewesen wie die Säugetiere auf die Zufuhr von Riboflavin angewiesen sind und deshalb zur Aufnahme von Riboflavin aus der Nahrung Riboflavin-spezifische Transporter besitzen. Für die Biosynthese der Flavine FMN und FAD wird Riboflavin durch die Riboflavin-Kinase zunächst an der Ribitylkette phosphoryliert und dann schließlich in zwei ATP-abhängigen Reaktionen durch die FAD-Synthase zu FAD adenyliert [2]. Ihre Diversität verdanken die Flavine den chemischen Eigenschaften des Isoalloxazinsystems. Zum einen erlaubt dieses das Vorliegen in mehreren Oxidationsstufen:

So können in biologischer Umgebung Flavine entweder voll oxidiert (Fl_{ox}), als rotes anionisches (Fl_{rad}^-) oder neutrales blaues ($\text{Fl}_{\text{rad}}\text{H}$) Semiquinon, oder als vollständig reduziertes Flavohydroquinon in anionischer (Fl_{red}^-) oder neutraler Form ($\text{Fl}_{\text{red}}\text{H}_2$) vorliegen [3]. Dies erlaubt die Teilnahme sowohl an Ein- als auch Zwei-Elektronen-Übertragungsreaktionen sowie eine Vermittlungsposition zwischen typischen Ein-Elektronensystemen wie dem Häm und Zwei-Elektronensystemen wie NAD(P)H, so dass Flavine oft in Multiredoxzentren vorliegen [3].

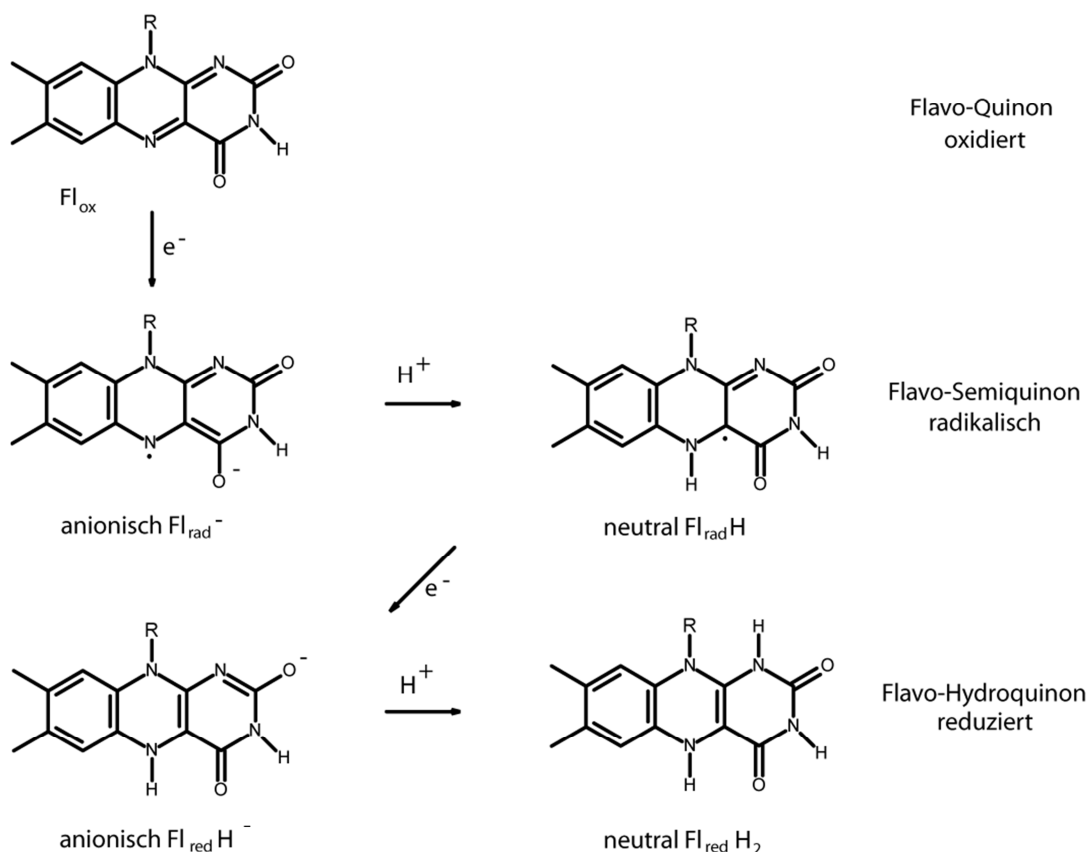


Abb. 2: Oxidationsstufen der Flavine

Lumiflavin : $\text{R}=\text{CH}_3$; Riboflavin: $\text{R}=\text{CH}_2(\text{CHOH})_3\text{CH}_2\text{OH}$; FMN: $\text{R}=\text{CH}_2(\text{CHOH})_4\text{-Phosphat}$; FAD: $\text{R}=\text{CH}_2(\text{CHOH})_4\text{-Pyrophosphat-Adenosin}$

Neben den vielfältigen Redox Eigenschaften weist der Isoalloxazinring außerdem außerordentliche spektroskopische Eigenschaften auf. Durch das ausgedehnte π -System kann Licht verschiedener Wellenlängen absorbiert und in einer Reihe von Folgereaktionen umgewandelt werden. Dieser Aspekt der Flavine soll im nächsten Kapitel ausführlicher betrachtet werden.

1.2 Photochemische Eigenschaften der Flavine

Flavine besitzen eine hohe Photoreaktivität, die seit mehreren Jahrzehnten intensiv erforscht wird. Während in photochemisch aktiven Flavoproteinen die Absorption von Licht üblicherweise zu Strukturänderungen innerhalb des Proteins führt, resultiert die photochemische Anregung freier Flavine und ihrer Photodegradationsprodukte in der Erzeugung reaktiver Spezies und der Reaktion mit anderen organischen Substanzen, was in beiden Fällen zur Schädigung weiterer Biomoleküle und schließlich zur Cytotoxizität führen kann [4].

Ihre Photoreaktivität verdanken die Flavine dem Isoalloxazinring, der im oxidierten Zustand Absorptionsmaxima bei 223, 266, 373 und 445 nm aufweist. Sind freie Flavine UV- oder blauem Licht ausgesetzt, gehen sie in einen angeregten Singulett-Zustand S_n über, der durch *Intersystem Crossing* (ISC) in den energieärmeren angeregten Triplett-Zustand T_1 wechselt, siehe Jablonski-Diagramm, Abb. 3. Diese Anregung des Flavins durch Licht geschieht in einer sehr kurzen Zeitspanne; so beträgt die Lebensdauer des angeregten Singulett-Zustands 5 ns [5], die des Triplett-Zustands 1 ms [6]. Obwohl der Singulett-Zustand der energiereichere Zustand ist, finden die meisten photochemischen Reaktionen aufgrund der längeren Lebensdauer aus dem Triplett-Zustand heraus statt.

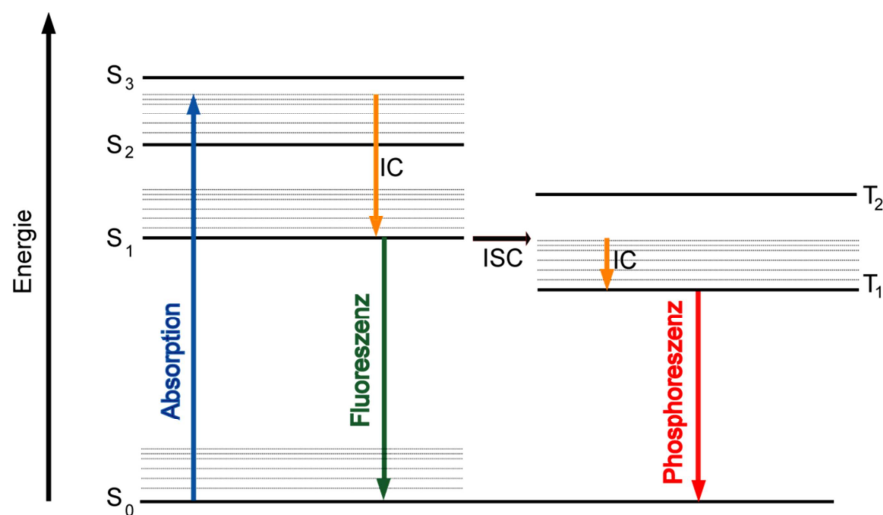


Abb. 3: Jablonski-Diagramm zur Erläuterung der Flavin-Energiezustände [7]

Durch Absorption eines Photons geht das Molekül vom Singulett-Grundzustand S_0 in einen angeregten Singulett-Zustand S_1, S_2 etc. über. Durch *Internal Conversion* (IC, strahlungslos) relaxiert das Molekül in den niedrigsten angeregten Singulett-Zustand S_1 ; die freiwerdende Energie wird hierbei als Wärmeenergie an das umgebende Lösungsmittel abgegeben. Durch Fluoreszenzemission kann das Molekül dann wieder den Grundzustand S_0 erreichen. Alternativ kann das Molekül auch durch *Intersystem Crossing* (ISC) und *Internal Conversion* (IC) in den ersten angeregten Triplett-Zustand T_1 übergehen. Der Übergang von hier aus in den Singulett-Grundzustand S_0 ist eigentlich spinverboten und hat deshalb eine lange Lebensdauer; diesen Übergang bezeichnet man als Phosphoreszenz.

1.2.1 Flavine als Photosensitizer

Eine schädigende Wirkung besitzen endogene Flavine als sogenannte Photosensitizer [4]. Dies ist von besonderer Bedeutung, da zum einen Flavine als Kofaktoren in einer Reihe von Proteinen vorliegen, zum anderen Riboflavin als Vitamin B₂ in vielen Nahrungsmitteln vorkommt.

Werden Riboflavin oder sein Photodegradationsprodukt Lumiflavin durch Licht in den Triplett-Zustand angeregt, können sie aus normalem, nicht-reaktiven Triplett-Sauerstoff hochreaktiven Singulett-Sauerstoff erzeugen und gehen dabei selbst wieder in den Grundzustand über. Diese Reaktion bezeichnet man als Photooxidation des Typs II. Dieser Singulett-Sauerstoff kann wiederum gefährliche Peroxide (ROOH) generieren, die verantwortlich für den Zerfall von Biomolekülen sind.

Der Flavin-Triplett-Zustand erzeugt jedoch nicht nur Singulett-Sauerstoff, sondern ist aufgrund seines hohen Redoxpotentials zusätzlich ein wirkungsvolles Oxidationsmittel und reagiert in Typ I Photooxidationsreaktionen mit verschiedenen organischen Verbindungen wie den aromatischen Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan oder Nucleotiden, was ebenfalls zur Zerstörung der Biomoleküle und zur Cytotoxizität führen kann [8]. Mechanistisch gesehen, abstrahiert hierbei das angeregte Flavinmolekül ein Wasserstoffatom oder ein Elektron von dem Substratmolekül wie etwa einer Aminosäure, einem Nucleotid oder Lipid, wobei Radikale entstehen, die wiederum schädliche Radikalkettenreaktionen z. B. mit $^3\text{O}_2$ eingehen können. Die reduzierten Flavine regenerieren sich nach Übertragung eines Elektrons auf $^3\text{O}_2$ unter Bildung von $\text{O}_2^{\cdot-}$, was die Entstehung weiterer reaktiver Sauerstoffspezies (H_2O_2 , $\cdot\text{OH}$) zur Folge haben kann. Eine Übersicht über die beiden Photooxidationsreaktionen der Flavine gibt Abb. 4.

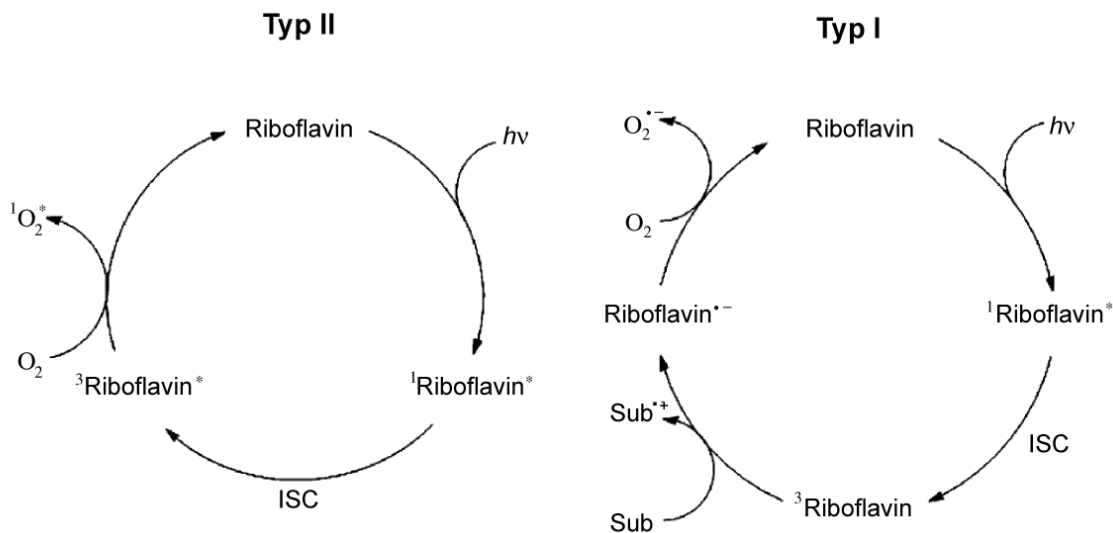


Abb. 4: Photooxidationsreaktionen der Flavine (entnommen aus [4])

Zum Schutz der Organismen gegen die photosensitivierende Wirkung von Flavinen haben sich im Laufe der Evolution verschiedene Antioxidantien und Quencher entwickelt. Wichtige Beispiele solcher Quencher sind die Carotinoide, die sich während der Evolution der Photosynthese zum Schutz des Photosyntheseapparates entwickelten oder die in der Pflanzenwelt ubiquitären Polyphenole (wie z.B. Flavonoide), die in hoher Konzentration in Blättern zum Oberflächenschutz gegen mechanische Schädigung und UV-Strahlung vorkommen. In Membranen vorliegende Tocopherole und Tocotrienole (Vitamin E) entwickelten sich zum Schutz gegen oxidative Schädigung in Chloroplasten und für eine längere Lebensdauer von Samen [4, 9].

Diese Quencher sorgen zum einen für eine Deaktivierung der angeregten Triplett-Zustände (Polyphenole, Vitamin E) oder des durch den Photosensitizer erzeugten Singulett-Sauerstoffs (Carotinoide).

1.2.2 Photodegradation von Flavinen

Wird Riboflavin (RF) dem Licht ausgesetzt, zersetzt es sich zu verschiedenen Photoprodukten [10], hierbei spielen sowohl der angeregte Singulett-Zustand als auch der angeregte Triplett-Zustand eine Rolle.

So werden Lumichrom (LC) und Cyclodehydroriboflavin (CDRF) durch eine intramolekulare Photoalkylierung (LC) bzw. eine intramolekulare Photoaddition (CDRF) aus dem angeregten Singulett-Zustand gebildet, während Formylmethylflavin (FMF) durch eine intramolekulare

Photoreduktion aus dem angeregten Triplet-Zustand gebildet wird. Das Zwischenprodukt FMF kann dann zu Carboxymethylflavin (CMF) oxidiert werden oder wird in Abhängigkeit vom Lösungsmittel zu LC oder LF hydrolysiert. Wie Riboflavin können auch die Photodegradationsprodukte als Photosensitizer wirken.

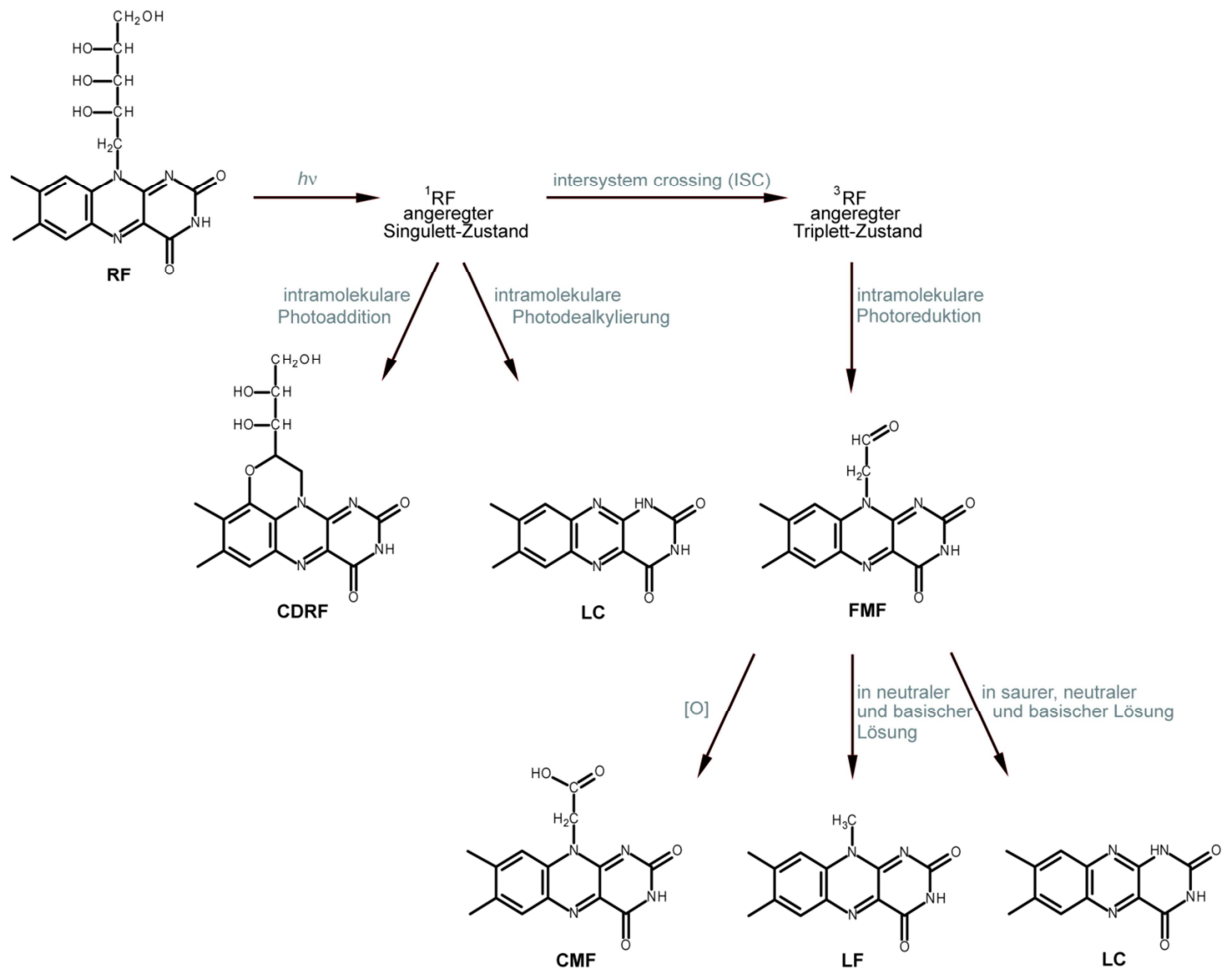


Abb. 5: Photodegradation von Riboflavin in wässriger Lösung (entnommen aus [10])

1.3 Flavoproteine

Flavoproteine machen durchschnittlich 1-3 % aller bakteriellen und eukaryotischen Proteine aus [11] und nehmen aufgrund ihrer chemischen Vielseitigkeit an vielen verschiedenen biologischen Prozessen teil; aufgrund ihres Flavin-Isoalloxazinrings besitzen sie zudem außerordentliche spektroskopische Eigenschaften, die sie zu einer der am besten untersuchten Gruppe von Protein macht [12]. So sind in den letzten Jahrzehnten zahlreiche Übersichtsartikel erschienen [1, 3, 12, 13].

In den meisten Flavoproteinen ist der Flavinkofaktor nicht-kovalent gebunden; nur etwa 10 % bilden eine kovalente Bindung mit dem Flavin aus; dabei geht das Protein entweder mit einem N3-Atom eines Histidinrestes eine Bindung mit dem 8 α -Atom des Flavins ein oder die Thiol-Gruppe eines Cysteins bindet an die 6-Position [14]. In 75 % aller Flavin-bindenden Proteine ist FAD als Kofaktor gebunden, nur 25 % enthalten FMN [13]. Die Bindung wird dabei wesentlich von der Adenosineinheit des FADs beeinflusst, da sich FMN- und FAD-Bindung in der Topologie der Bindungstasche unterscheiden. Bevorzugte Strukturen für die Bindung von FMN sind das (β/α)-*barrel* und die Flavodoxin-artige Faltung, während FAD-bindende Proteine hauptsächlich die Rossman-Faltung annehmen [13].

Die bedeutendste Funktion von Flavoproteinen ist die als biologischer Redoxkatalysator. Als solcher sind sie beteiligt an der Dehydrogenierung von NAD(P)H, Lipidestern und D-Aminosäuren, der Oxidation von Aminen zu Iminen, der Bindung und dem Bruch von Disulfidbrücken sowie der Hydroxylierung von aromatischen Substraten und der Aktivierung von molekularem Sauerstoff. Des weiteren sind sie an Elektronentransportprozessen wie der Photosynthese und der oxidativen Phosphorylierung beteiligt und sind oft als Vermittler zwischen typischen Zwei-Elektronen-Donoren wie NADH und Ein-Elektronen-Akzeptoren wie etwa dem Häm oder Eisen-Schwefel-Clustern tätig [3, 15-17]. So sind etwa 90 % aller Flavoproteine an Redoxreaktionen beteiligt [13].

Das Redoxpotential, das bei freien Flavinen bei etwa -200 mV beträgt, kann durch Interaktion mit dem Protein zwischen -495 (gemessen beim $\text{Fl}_{\text{rad}}\text{H}/\text{Fl}_{\text{red}}\text{H}^-$ -Paar im *Azotobacter vinelandii* Flavodoxin [18]) und +80 mV (beobachtet beim $\text{Fl}_{\text{ox}}/\text{Fl}_{\text{rad}}^-$ -Paar in der Thiamin Dehydrogenase [19]) liegen. Beeinflusst wird das Redoxpotential dadurch, wie die durch Reduktion entstehende negative Ladung durch das Protein stabilisiert werden kann. So sorgt eine positive Ladung um den Pyrimidinring herum für eine Erhöhung des Redoxpotentials, eine negative Ladung oder eine hydrophobe Umgebung erniedrigt es [16].

Mit zu den am besten charakterisierten Flavoproteinen gehören die **Flavodoxine** – kleine Flavin-bindende Redoxproteine einer Länge von 140-180 AS, die in Bakterien und Algen, jedoch nicht in höheren Organismen vorkommen (siehe Übersichtsartikel [20-22]). Der redox-aktive Part ist in Flavodoxinen ein nicht-kovalent gebundenes FMN-Molekül, das als Semiquinon/Hydroquinonpaar mit niedrigem Redoxpotential vorliegt, wodurch es seine physiologische Rolle als Ein-Elektronenüberträger in Prozessen wie z.B. der Photosynthese oder der Stickstofffixierung [20, 23, 24] wahrnehmen kann (für weitere Funktionen siehe [22]). Die Struktur der Flavodoxine besteht aus einem fünfsträngigen parallelen β -Faltblatt,

das auf beiden Seiten von α -Helices flankiert ist [20, 21, 25, 26], siehe Abb. 6A. Das FMN-Molekül wird dabei hauptsächlich durch atypische Wasserstoffbrückenbindungen zum Phosphat [27] sowie koplanare Interaktion des Isoalloxazinrings mit zwei hochkonservierten aromatischen Aminosäuren stabilisiert [21], die sowohl das Redoxverhalten des Flavodoxins als auch die spektroskopischen Eigenschaften wesentlich beeinflussen [28, 29]. Eine ausführlichere Beschreibung der FMN-Bindung findet sich in der Legende zu Abb. 6.

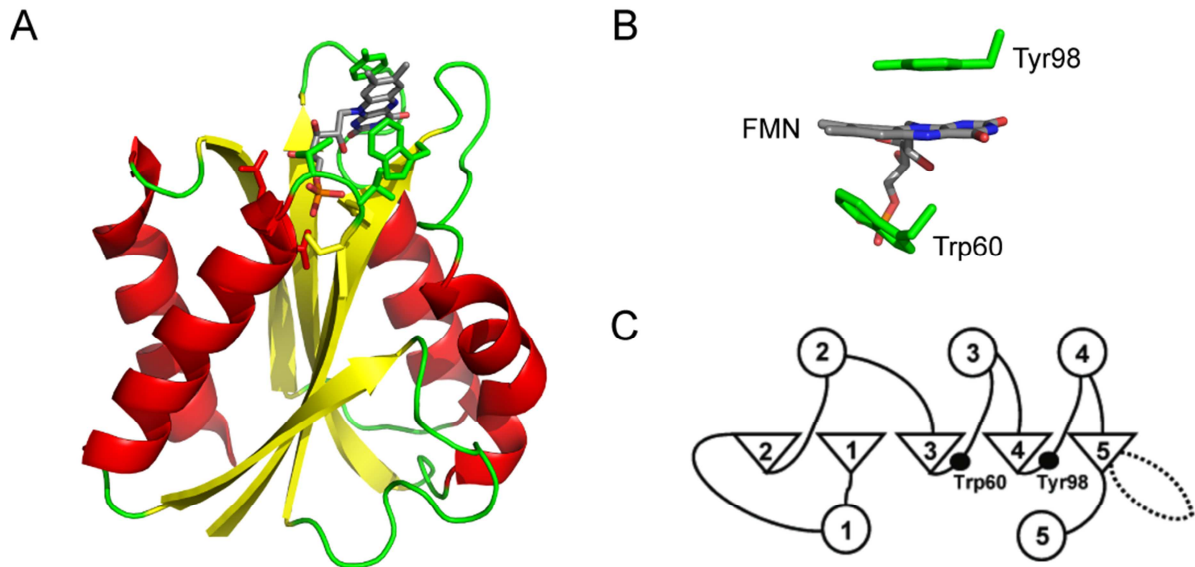


Abb. 6: Kristallstruktur des Flavodoxins aus *Desulfovibrio vulgaris*

A: Die Struktur des *D. vulgaris* Flavodoxins ([26], pdb-Eintrag 2fx2) zeigt die typische Flavodoxin-Faltung aus einem fünfsträngigen parallelen β -Faltblatt (gezeigt in gelb), das auf beiden Seiten von α -Helices (gezeigt in rot) umgeben ist. Die FMN-Bindungstasche befindet sich auf der Oberfläche des Proteins; an der Stabilisierung des FMNs sind hauptsächlich die Reste dreier flexibler Loopregionen (grün dargestellt) beteiligt (siehe auch C).

B: Das FMN-Molekül ist von zwei stark konservierten aromatischen Aminosäureresten (Tyr98 und Trp60 im *D. vulgaris* Flavodoxin) sandwichartig umgeben. Hierbei ist die Phenolgruppe des Tyrosins in allen Flavodoxinen fast coplanar zur *si*-Seite des Isoalloxazins, der Winkel zwischen der Indolgruppe des Tryptophan zum Isoalloxazinrest des Flavins beträgt im *D. vulgaris* Flavodoxin 45° .

C: Schematische Zeichnung der allgemeinen Flavodoxin-Topologie [30]. Helices sind als Kreise, β -Faltblätter als Dreiecke, Loops als Linien abgebildet. Die gepunktete Linie entspricht einer Insertion im fünften β -Strang, den die *long-chain* Flavodoxine im Gegensatz zu den *short-chain* Flavodoxinen aufweisen [31, 32]. Hervorgehoben sind die Aminosäuren Trp60 und Tyr98 (bezogen auf das *D. vulgaris* Flavodoxin), die FMN-Phosphatbindungsstelle befindet sich zwischen $\alpha 1$ und $\beta 1$. $\alpha 2$ ist im *D. vulgaris* Flavodoxin sehr kurz und daher nicht als Helix in Teilabbildung A erkenntlich.

Die Teilabbildung A und B wurden anhand des pdb-Eintrags 2fx2 der RCSB-Proteindatenbank mit PYMOL erstellt.

Ihre vielfältige Reaktionsfähigkeit verdanken die Flavine auch der Tatsache, dass die unter physiologischen Zuständen erreichten unterschiedlichen Redoxzustände je nach Zustand UV-A, blaues, grünes und in einigen Fällen sogar rotes Licht effizient absorbieren können [33]. So gibt es neben den an Redoxreaktionen beteiligten Flavoproteinen drei

Proteinfamilien, die die Absorption des Flavinkofaktors im UV- oder Blaulichtbereich des sichtbaren Lichts für ihre physiologische Funktion nutzen. Dies sind zum einen die drei Blaulicht-Photorezeptoren in LOV- oder BLUF-Proteinen und Cryptochromen, zum anderen die mit den Cryptochromen verwandten Photolyasen.

In **LOV** (*light, oxygen or voltage*)-**Domänen**, die als N-terminale Domäne in einer Reihe von Proteinen vorkommen, führt die Absorption von blauem Licht zu einem Flavin-C4(a)-Cysteinyll-Addukt [34] und einer resultierenden Strukturveränderung. In Abhängigkeit von der interagierenden *Output*-Domäne werden auf diese Weise verschiedene zirkadianische und regulierende Prozesse gesteuert [35]. So sind die LOV-Domänen in Phototropinen für den Phototropismus, die Regulierung der Blatt- und Stomata-Öffnung und die Chloroplastenbewegung zuständig [36]; in Bakterien spielen sie eine Rolle bei der allgemeinen Stressantwort [37], die Physiologie der Zellhülle [38, 39] und der Virulenz [40]. Neben den LOV-Domänen gibt es die **BLUF** (*Blue light using FAD*)-**Domänen**, [33, 41], die in Bakterien und Algen als Einzel- oder Multidomänenproteine je nach Art des *downstream* liegenden Proteins für Prozesse wie die Biofilmformation, die Toxizität oder phototaxische Antwort zuständig sind [41, 42]. Hier führt die Absorption von blauem Licht zu einem licht-induzierten Elektronentransfer auf das photoaktivierte FAD und einer daraus resultierenden Veränderung des Wasserstoffbrückennetzwerks um das Flavin [41].

Die dritte Proteinfamilie besteht aus den Photolyasen und den mit ihnen verwandten Cryptochromen (siehe Übersichtsartikel [33, 43-45]). In **Photolyasen** können Flavine Lichtenergie zur Reparatur von UV-induzierten DNA-Schäden verwenden; je nach Art des reparierten DNA-Schadens unterscheidet man zwischen den (6-4)-Photolyasen und den CPD-Photolyasen. Bei der Reparatur absorbiert ein Antennenkofaktor ein UV- oder Blaulichtphoton und überträgt die Anregungsenergie mittels Fluoreszenzenergietransfer auf ein vollständig reduziertes FADH⁻, das dann in einem cyclischen Elektronentransfer das kovalente Pyrimidindimer repariert [44, 45]. In **Cryptochromen** sorgen photoaktivierte Flavine für wichtige sensorische Schlüsselfunktionen wie etwa den Tag-Nacht-Rhythmus bei Tieren und Pflanzen oder die Orientierung am Magnetfeld der Erde bei Zugvögeln [33]. Hier führt die Absorption von blauem Licht zu intramolekularen Redoxreaktionen des FAD-Kofaktors und daraus resultierenden Konformationsänderungen des Proteins. Zum genauen Mechanismus siehe [46]. Die erst vor relativ kurzer Zeit entdeckten DASH-Cryptochrome mit teilweise noch ungeklärten sensorischen Funktionen ähneln strukturell stark den Photolyasen und besitzen wie diese DNA-Reparaturaktivität [43].

Flavoproteine können jedoch nicht nur an Redoxreaktionen beteiligt sein und als Photorezeptoren agieren, auch Transport und Speicherung von Flavinen ist Aufgabe von Flavoproteinen; dies ist von besondere Bedeutung bei Organismen, die selbst kein Riboflavin synthetisieren können.

Der Transport von Riboflavin im Blutplasma von Säugetieren ist unter normalen Umständen unspezifisch und wird von Albumin und Immunoglobulinen übernommen [47, 48]. Während der Schwangerschaft wird jedoch aufgrund des erhöhten Vitamin B₂-Bedarfs zur Produktion von Flavoproteinen ein Riboflavin-bindendes Protein (RfBP) gebildet, das das Riboflavin im Blutserum durch die feto-placentale Membran transportiert und somit eine Versorgung des Fötus mit Riboflavin sicherstellt [49]. In Vögeln und Reptilien wird das RfBP in der Leber produziert, ins Blut sekretiert und in Eidotter und Eiweiß abgegeben [48].

Am besten charakterisiert ist das **RfBL aus Hühnereiweiß**, dessen Kristallstruktur 1997 von Monaco gelöst wurde [47], siehe Abb. 7. Es ist ein 219 Aminosäuren langes Protein mit hoher thermischer Stabilität und einer bevorzugten Bindung von Riboflavin gegenüber FMN und FAD [50]. Ein interessanter Effekt der Riboflavinbindung ist der komplette Fluoreszenzquench, der bei der Bindung von freiem Riboflavin auftritt und durch die Bindung des Riboflavins zwischen zwei aromatischen Aminosäuren verursacht wird [47, 51].

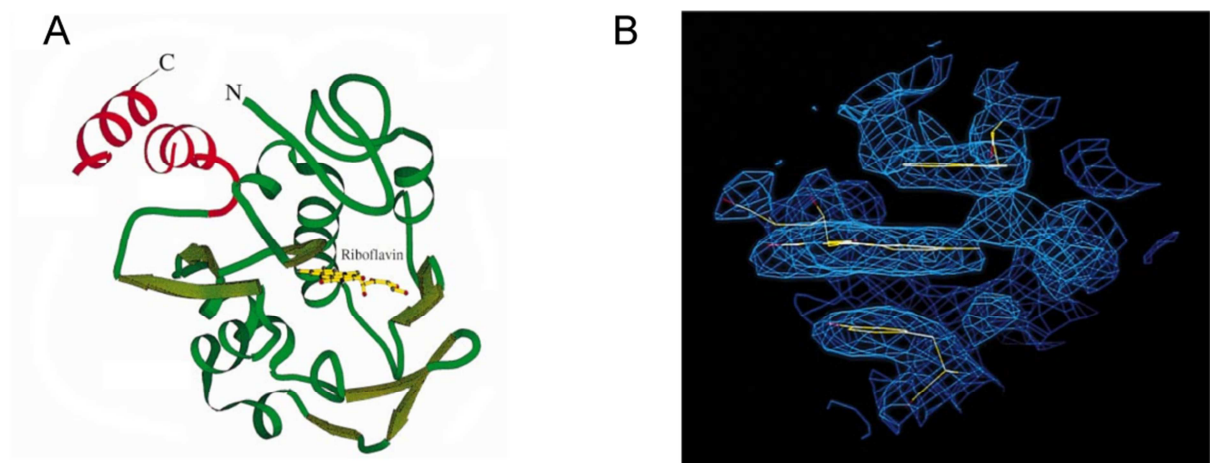


Abb. 7: Kristallstruktur des Riboflavin-bindenden Proteins aus Hühnereiweiß

A: 2.5 Å Kristallstruktur des Riboflavin-bindenden Proteins aus Hühnereiweiß als Ribbondiagramm mit eingezeichnetem Riboflavin (gelb). Die Lücke zwischen den beiden rot gezeichneten Helices kennzeichnet einen ungeordneten Bereich des Moleküls. B: Darstellung der Elektronendichte des Riboflavinmoleküls und der Aminosäuren Tyr75 und Trp156 bei einem Konturierungslevel von 1.0 σ . Diese Abbildungen wurden entnommen aus [47].

Neben Säugetieren, Vögeln und Reptilien besitzen auch Insekten Riboflavin-bindende Proteine. Im Hämolymp wird Riboflavin während des späten Larven- oder Puppen-Stadiums

von Flavin-bindenden Hexamerinen – insektenspezifischen hexameren Speicherproteinen mit einem Molekulargewicht von 70-85 kDa – und einem Lipophorin gebunden [52].

1.4 Coenzym A-bindende Proteine

Coenzym A (CoA) ist ein lebensnotwendiger Kofaktor in allen lebenden Organismen. Er agiert als Acylcarrier oder Carbonylgruppenaktivator in einer Reihe zentraler biochemischer Stoffwechselwege wie zum Beispiel dem Citratzyklus oder dem Fettsäuremetabolismus. In acetylierter Form ist er ein wichtiges Intermediat im Metabolismus beinahe aller biologischen Komponenten wie zum Beispiel Aminosäuren, Carbonsäuren und Fetten. Schätzungweise nutzen 4 % aller bekannten Enzyme CoA als Kofaktor [53].

Viele Bakterien, Hefen und Pflanzen können CoA *de novo* aus Aspartat und Ketovalerat über die Zwischenstufe der Pantothersäure synthetisieren, während Tiere und einige pathogene Microben darauf angewiesen sind, Pantothersäure (Vitamin B₅) mit der Nahrung aufzunehmen [53].

Die Struktur von CoA [54] ist in Abb. 8 gezeigt. Es kann in ein 3'-Phosphat-ADP, Pantothersäure und β -Mercaptoethylamin unterteilt werden. Die funktionelle Gruppe des Coenzym A ist die Thiolgruppe des β -Mercaptoethylamins, das Acylgruppen mithilfe einer Thioesterbindung binden kann.

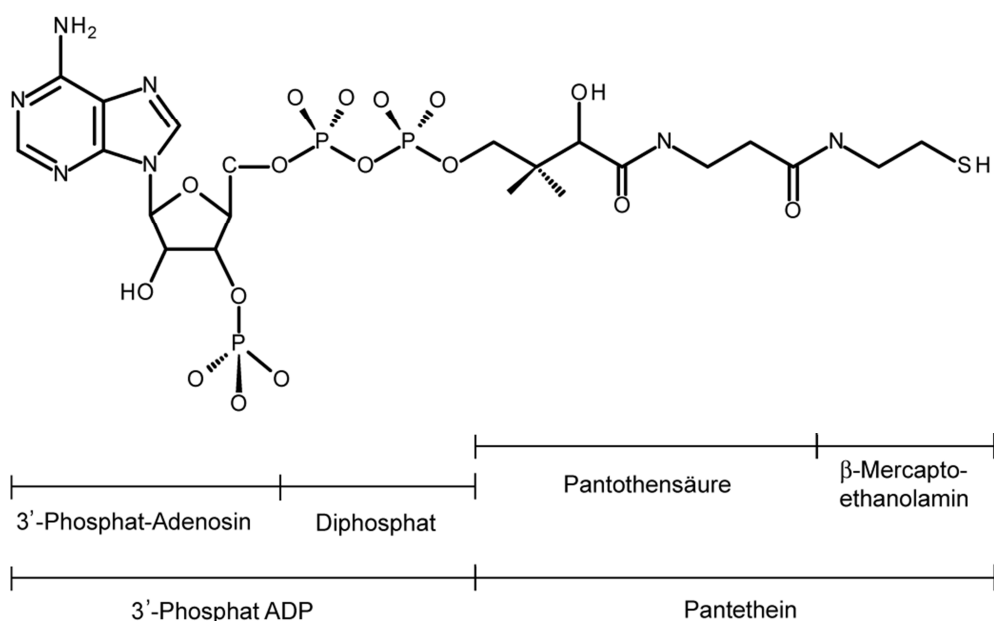


Abb. 8: Strukturformel von Coenzym A

Da bei der Hydrolyse einer Thioesterbindung Energie vergleichbar mit dem Gruppenübertragungspotential von ATP frei wird, ist die Acylgruppe des CoA eine aktivierte Gruppe, die leicht auf andere Akzeptoren übertragen werden kann. Außerdem werden durch die Reaktivität der Thioesterbindung Reaktionen am α - und β - Kohlenstoffatom der Acylgruppe erleichtert.

Obwohl es kein einheitliches CoA-Bindungsmotiv gibt und die Strukturen CoA-bindender Proteine eine hohe Diversität in ihrer Faltung aufweisen, gibt es einige strukturelle Gemeinsamkeiten, die in fast allen CoA-bindenden Proteinen auftreten [55]: Zum einen kommen CoA-bindende Proteine meist in oligomerer Form vor, in der das Coenzym an der Kontaktfläche der Untereinheiten gebunden ist. Das 3'-Phosphat der Ribose ist in den meisten Proteinen Solvens-exponiert und die Adenineinheit weist ins Innere des Proteins. Während die Aminogruppe des Adenins durch Wasserstoffbrückenbindung mit Hauptkettenatomen des Proteins wechselwirkt, sind die Phosphatgruppen neben der Stabilisierung durch Wasserstoffbrückenbindungen zu polaren Seitenketten an einer Reihe von Salzbrücken zu Lysin- oder Argininresten involviert.

Betrachtet man allein die Konformation des Coenzym, zeigt sich, dass das Adenosin und die Pantetheingruppe in allen CoA-bindenden Proteinen ähnliche Konformationen aufweisen: In fast allen ist das Nucleosid in der 2'-*endo* Konformation mit einem *anti*-glycosidischen Torsionswinkel gebunden; der Pantetheinarm ist in den meisten Fällen gestreckt. Große Unterschiede gibt es jedoch in der Art, wie das CoA an der Pyrophosphatgruppe abgeknickt ist. Während bei der Enoyl-CoA Hydratase [56], der Citrat Synthase [57] und dem Acyl-CoA-Bindenden Protein [58] das Coenzym so stark abgeknickt ist, dass die Atome des Adenins in engem Kontakt zur Pantetheingruppe stehen, weisen andere Proteine eine geringere Biegung auf oder liegen wie in der 3-HMG-CoA Dehydrogenase [59] in annähernd gestreckter Konformation vor.

1.5 Dodecamere Proteinkomplexe

Proteine aggregieren oft zu heteromeren oder homomeren Proteinkomplexen. Dabei bilden homomere Proteinkomplexe, die von mehreren Kopien desselben Proteins gebildet werden, die Mehrheit der bekannten Proteinkomplexstrukturen: 69.8 % der Proteine bekannter dreidimensionaler Struktur sind Homomere, in weiteren 20 % gibt es mindestens eine

Interaktion zwischen homomeren Proteinuntereinheiten, während in nur 10 % aller Komplexen ausschließlich Wechselwirkungen zwischen Heteromeren auftreten [60].

Die Vorteile von homo-oligomeren Komplexen sind die erhöhte Stabilität, Resistenz gegen proteolytische Degradation, die allosterische Regulierbarkeit, multivalente Bindung, sowie Kontrolle über Verfügbarkeit und Spezifität der Bindungsstellen [61, 62]. Die Bildung einer Struktur aus mehreren kleinen Untereinheiten benötigt außerdem weniger genetisches Material [63].

Die Anordnung der Untereinheiten zueinander ist in den meisten Fällen symmetrisch; viele Oligomere besitzen einfache Punktgruppensymmetrien. Zweifache Rotationssymmetrie findet man zum Beispiel in den Immunglobulinen, dreifache im Bakteriochlorophyll Protein, während höhersymmetrische Komplexe seltener sind. Weitverbreitet sind auch Kombinationen aus zweifacher und dreifacher Symmetrie: 32-Symmetrie tritt in der Aspartat Transcarbamoylase und dem Zink Insulin Hexamer auf, 432-Symmetrie wird in den Ferritinen beobachtet, und sphärische Viren besitzen oft 532-Symmetrie [63].

In einer Reihe von Proteinen kommen homomere dodecamere Proteinstrukturen vor: In Phagen bilden z.B. dodecamere Ringe einen Eingangskanal, durch den DNA in den Wirtsorganismus übertragen werden kann [64]. Die Struktur eines solchen röhrenförmigen Tunnels ist in Abb. 9 A zu sehen: Das **Portalprotein** des Bakteriophagen P22 faltet sich zu einem ~0.96 MDa großen Ring von 12 identischen Untereinheiten, die symmetrisch um einen zentralen Kanal mit einem Durchmesser von 170 Å und einer Länge von ~300 Å angeordnet sind [65].

Des Weiteren können *small heat shock proteins* (sHSPs) als dodecamere Komplexe vorliegen. sHSPs sind Chaperone, die Proteinaggregation während eines Hitzeschocks kontrollieren und damit den Zelltod regulieren [66]. Sie haben eine hohe Bindungsaffinität zu nicht-nativen Proteinen und präsentieren diese einem ATP-abhängigen Rückfaltungssystem [67]. Alle sHSPs besitzen die Tendenz, zu größeren Homo-Olimeren aus 12-42 Untereinheiten zu aggregieren [68]; so bilden im Falle des **Hitzeschock-Proteins 16.9** aus Weizen zwei hexamere Scheiben einen dodecameren Komplex mit 32-Symmetrie [69] (siehe Abb. 9 B).

Ebenfalls aus hexameren Doppelscheiben bestehen außerdem die für den Stickstoff-Stoffwechsel essentielle **Typ III Glutamin Synthetase** [70], der **Pyridoxal 5'-Phosphat (PLP) Synthase Komplex**, der an der Bildung von PLP – der aktiven Form von Vitamin B₆ – beteiligt ist [71] sowie die in Abb. 9 C gezeigte **Ca²⁺/Calmodulin-abhängige Kinase II** (CaMKII) des Menschen [72]. Diese übersetzt intrazelluläre Ca²⁺-Signale in die

Phosphorylierung von Ionenkanälen, was letztendlich Auswirkungen auf die synaptische Stärke hat.

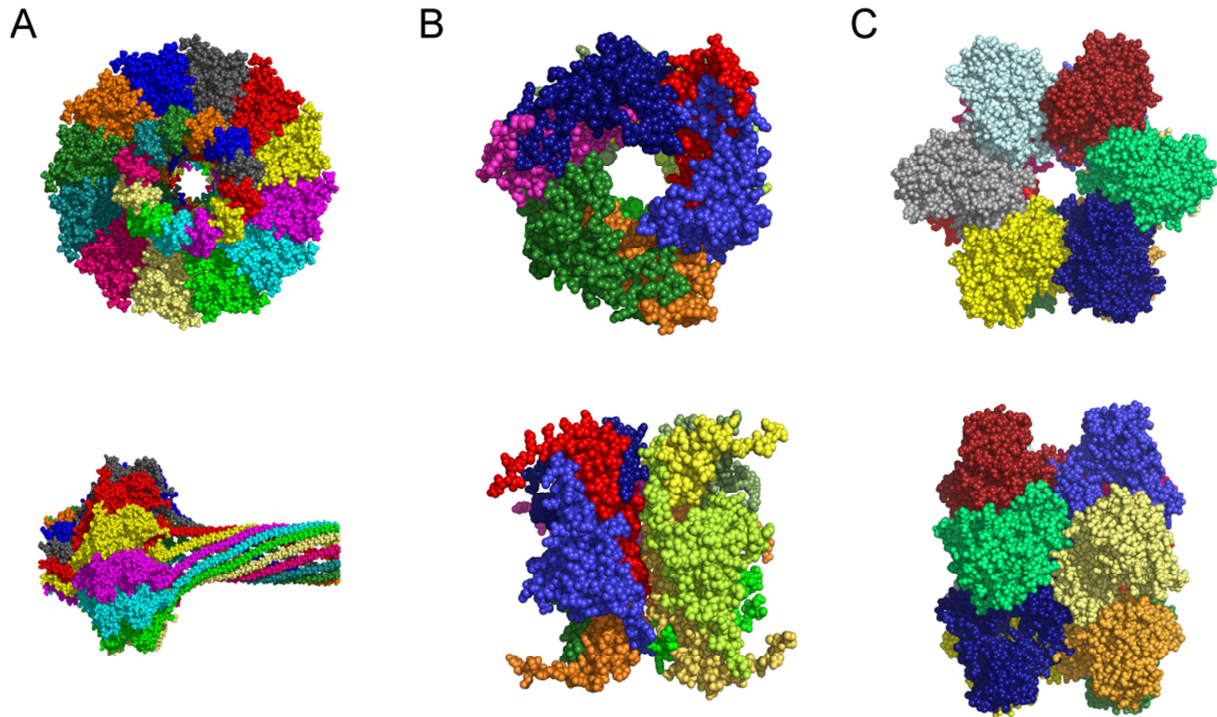


Abb. 9: Kristallstrukturen dodecamerer Proteinkomplexe

A: Die 3.25 Å Kristallstruktur des Viralen Portalproteins des Bakteriophagen P22 (pdb-Eintrag 3lj5) weist einen Ring aus zwölf symmetrisch angeordneten Untereinheiten auf [65].

B: Die 2.7 Å Kristallstruktur des *small heat shock proteins* (sHSP) 16.9 aus Weizen (pdb-Eintrag 1gme) zeigt die Anordnung zweier hexamerer Ringe zu einer Doppelscheibe [69].

C: Die 3.5 Å Kristallstruktur der menschlichen Ca^{2+} /Calmodulin abhängigen Kinase II (pdb-Eintrag 3soa) zeigt den dodecamere Komplex bestehend aus zwei hexameren Ringen [72].

Jede Untereinheit ist in einer anderen Farbe dargestellt. Für die unteren Abbildungen sind die oberen um 90 ° nach links gedreht.

Die Abbildung wurde anhand der in der RCSB-Proteindatenbank hinterlegten pdb-Dateien mit PYMOL erstellt.

Bislang sind nur wenige Proteinfamilien mit kubischer 23-Punktsymmetrie bekannt. Die wohl prominentesten Vertreter dieser Struktur sind die Dps-Proteine – *DNA binding protein from starved cells* [73] – und die mit ihnen verwandten dodecameren Ferritine [74, 75]. Ebenso bilden die Typ II Dehydroquinasen [76] üblicherweise dodecamere Komplexe. Des Weiteren bevorzugen Bromoperoxidasen [77], Ornithin-Carbamoylasen [78-80], Mitglieder der HFCD (*homo-oligomeric flavin-containing cysteine decarboxylase*)-Familie [81-83] und selbst Proteasen mancher Organismen [84, 85] dodecamere Komplexe mit kubischer 23-Punktsymmetrie.

Bei der kubischen 23-Punktsymmetrie handelt es sich um eine Symmetrie, die sich auf den Aufbau des Komplexes bezieht, siehe Abb. 10. Hier sind dreizählige Achsen mit zweizähligen Achsen kombiniert und die Untereinheiten sind so angeordnet, dass vier Trimere an die Eckpunkte eines Tetraeders (mit roten Linien dargestellt) platziert sind. Drei zweizählige Achsen gehen durch die Mitte der Tetraederkante und das Zentrum der Struktur (grün dargestellt). Vier dreizählige Achsen (blau dargestellt) gehen durch die Eckpunkte des Tetraeders und das Zentrum der gegenüberliegenden Fläche. Dementsprechend gibt es zwei nicht-äquivalente dreizählige Symmetriestellen, die ebenso wie die zweizähligen Symmetriestellen als Poren ins Innere des Komplexes dienen können.

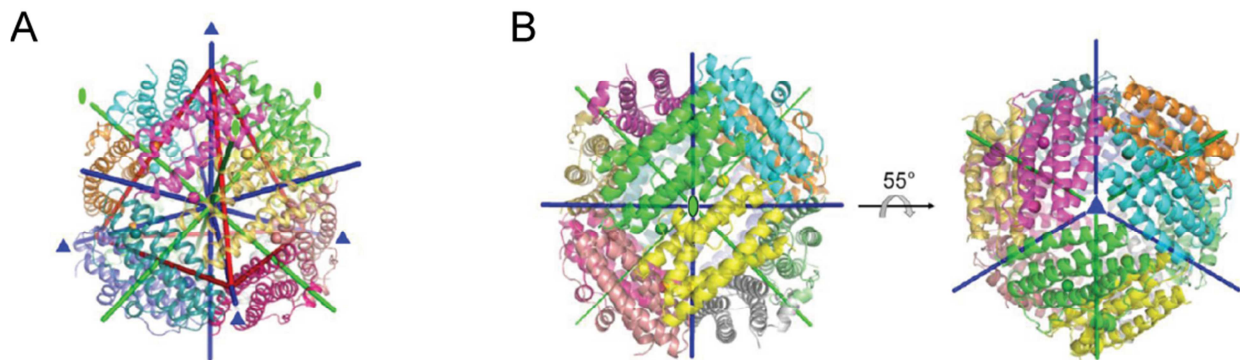
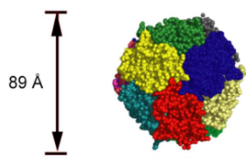


Abb. 10: Struktur eines dodecameren Komplexes mit 23-Punktsymmetrie [86]

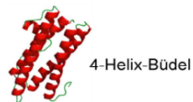
Die Struktur des *H. pylori* Neutrophil-aktivierenden Proteins (HP-NAP) – einem Mitglied der Dps-Familie – zur strukturellen Erläuterung 23-symmetrischer Proteinkomplexe ([86] pdb-Eintrag 3ta8).

A: Struktur des Dodecamers mit eingezeichnetem Tetraeder zur besseren Darstellung der Struktursymmetrie. Grüne Linien entsprechen den zweizähligen, blaue Linien den dreizähligen Achsen. B: Ansicht entlang einer zweizähligen (links) und entlang einer der dreizähligen Achsen (rechts).

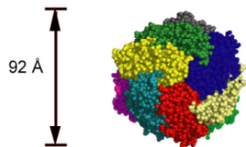
Für kubische Komplexe wird berichtet, dass sie aufgrund ihrer Eigenschaft, innere Hohlräume auszubilden, primär eine Rolle bei der Speicherung und dem Transport von Molekülen spielen [61]. Dies trifft in den hier genannten Komplexen ausschließlich auf die **Ferritine** evtl. auch auf die **Dps-Proteine** zu, die unter Normal- (Ferritine) und Stress- (Dps-Proteine) Bedingungen für die Speicherung von Eisenionen im Inneren des Komplexes sorgen; in beiden Proteinfamilien werden Eisen (II)-Ionen zu Eisen (III) oxidiert und im Innern der Hohlkugel als Ferrihydrit gespeichert. Der Zugang zum Inneren erfolgt dabei jeweils durch Poren entlang der dreizähligen Achse [87]. Die anderen oben aufgelisteten Proteine spielen dagegen eine Rolle bei verschiedenen Biosynthesewegen. Hierbei scheint oft die dodecamere Anordnung nicht unbedingt essentiell für die Funktion zu sein.



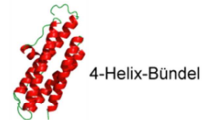
Ferritin aus *Listeria innocua* (1qgh)



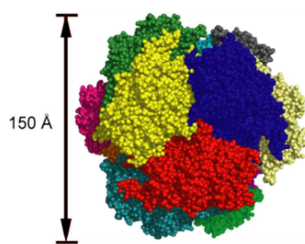
Speicherung von Eisen-Ionen,
unter Stress auch antioxidierende Wirkung
durch Detoxifikation von Eisen und Disauerstoff



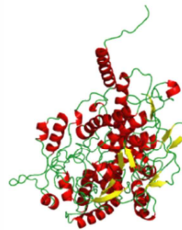
Dps aus *Escherichia coli* (1dps)



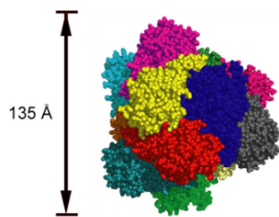
Bindung von Eisen unter Nahrungsmangel
oder oxidativem Stress,
unspezifische DNA-Bindung



Bromoperoxidase aus *Corallina officinalis* (1qhb)



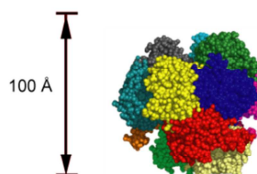
Bromierung organischer Substrate durch Katalyse
der Reaktion von H_2O_2 mit Br^- zu HOBr



Aminopeptidase aus *Pyrococcus horikoshii* (1y0y)



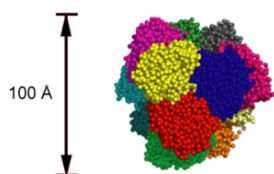
Abbau von Peptiden



EpiD aus *Staphylococcus epidermis* (1g63)



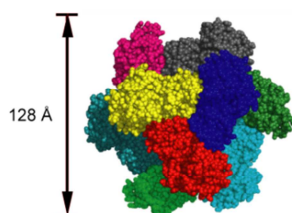
Beteiligung an Epidermin-Biosynthese
durch Generierung eines reaktiven (Z)-enethiol-
Intermediates durch oxidative Decarboxylierung



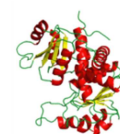
Typ II Dehydroquinase aus *Streptomyces coelicolor* (1gu1)



Beteiligung an Synthese aromatischer AS
durch Katalyse der Dehydrierung
von Dehydroquinat zu Dehydroshikimat



Ornithin Carbamoylase aus *Pyrococcus furiosus* (1a1s)



Beteiligung an Arginin-Biosynthese durch Katalyse
der Reaktion von Citrullin mit Phosphat zu Ornithin und
Carbamoylphosphat

Abb. 11: Proteinkomplexe mit kubischer 23-Symmetrie

Jeweils ein Beispiel aller bisher bekannten Proteinfamilien mit kubischer 23-Symmetrie ist hier als Dodecamer bzw. als Monomer dargestellt. Hierbei sind in den Dodecamerstrukturen die unterschiedlichen Monomere unterschiedlich eingefärbt, die Blickrichtung ist jeweils entlang einer dreizähligen Achse. Die neben dem Pfeil angegebene Länge entspricht jeweils dem äußeren Durchmesser des dodecameren Komplexes. Außerdem ist die Monomerstruktur mit Sekundärstrukturelementen (gelb für β -Stränge, rot für α -Helices und grün für Loops) dargestellt, besondere Faltungsmuster sind jeweils vermerkt. Angegeben ist zusätzlich die Proteinfunktion. Die Abbildungen wurden anhand der in der RCSB-Datenbank hinterlegten pdb-Dateien mit Pymol erstellt.

Mitglieder der **HFCD-Familie** liegen z.B. normalerweise als Trimer vor [88], während bis jetzt nur für die **Decarboxylasen Pad1** [82], **UbiX** [81] und **EpiD** [83, 89] eine dodecamere Struktur bekannt ist. In verschiedenen **Bromoperoxidasen**, die normalerweise als Monomer oder Dimer vorliegen [90], sorgt die dodecamere Anordnung für eine hohe Temperaturstabilität [91] und ist somit eine Anpassung an die Lebensbedingung des Organismus; so verhindert sie in Algen einen Verlust der Hydrathülle des Proteins bei niedrigen Tieden und sichert damit das Überleben [77]. Diese beobachtete Stabilität ist zwar eine generelle Eigenschaft von Haloperoxidasen [90], wird jedoch in anderen Mitgliedern dieser Familie z.B. durch die Ausbildung von intra- und intermolekularen Disulfidbrücken erreicht [92]. **Ornithin Carbamoylasen** bilden üblicherweise Trimere; hier sorgt die dodecamere Anordnung in *Mycoplasma penetrans* [80], *Pyrococcus furiosus* [78], *Thermatoga maritima* (nur pdb-Eintrag 1vlv) und *Pseudomonas aeruginosa* [79] für eine allosterische Regulation in *P. aeruginosa* [79] bzw. hohe Temperaturstabilität in *P. furiosus* und *T. maritima* [78, 80]. Für **Typ II Dehydroquinasen** scheint hingegen die dodecamere Anordnung essentiell zu sein, da die aktiven Zentren an den Kontaktflächen der Trimere liegen. Dimere Typ II Dehydroquinasen sind zwar auch bekannt, weisen jedoch keine enzymatische Aktivität auf [93]. Bei den **tetraedrischen Aminopeptidasen** scheint wiederum die Form des Dodecamers eine Rolle zu spielen. Üblicherweise bilden Proteasen und Aminopeptidasen eher hocholigomere Ring- oder Faserstrukturen aus, jedoch sind für die Aminopeptidasen aus *Haloarcula marismortui* [85] und *Pyrococcus horikoshii* [84] dodecamere Hohlkugelstrukturen beobachtet worden. So besitzt die Aminopeptidase TET aus *H. marismortui*, die einen äußeren Durchmesser von 150 Å aufweist, entlang der dreizähligen Achsen zwei Arten von Poren: Durch einen Tunnel mit einem Durchmesser von 21 Å können kleine Proteine in die 35 Å große zentrale Cavität, in der das aktive Zentrum liegt, vordringen und einzelne Aminosäuren können diese dann durch eine Pore mit einem Durchmesser von 17 Å wieder verlassen. Die kleinere Aminopeptidase aus *P. horikoshii* besitzt dagegen vier

Tunnel mit je einem Durchmesser von nur 10 Å, lokalisiert auf der Tetraederseite des Dodecamers, so dass hier auch nur kleine Peptide verdaut werden können.

1.6 Dodecine

Bei Dodecinen handelt es sich um kleine flavinbindende Proteine mit kubischer 23-Punktsymmetrie. Ihren Namen erhielten sie aufgrund der dodecameren Anordnung der monomeren Untereinheiten sowie ihrer Fähigkeit, Flavine zu binden.

Dodecine wurden erstmals im Zuge eines inversen Strukturgenomik-Projektes an halophilen Organismen im halophilen Archaeobakterium *Halobacterium salinarum* entdeckt. Hierbei wurde das *H. salinarum* Proteom erst fraktioniert und dann systematisch auf kristallisierbare Proteine untersucht. Die erhaltenen orangefarbenen *shot-gun* Kristalle wurden durch Edman-Abbau sequenziert und die Sequenz mit der Genomsequenz des *H. salinarum* abgeglichen; sie entsprach dem *open reading frame* OE3073R, einem hypothetischen Protein mit bislang noch unbekannter Funktion (Essen *et al.* unveröffentlicht, [94]).

1.6.1 Die Struktur des *H. salinarum* Dodecins

Das Dodecin aus *H. salinarum* ist ein sehr kleines Protein mit nur 68 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 7438 Da. Röntgenstrukturanalysen zeigen, dass es eine sehr einfache Struktur aus einer α -Helix und einem dreisträngigen antiparallelen β -Faltblatt besitzt (Abb. 12 C).

Zwölf dieser kleinen Proteine lagern sich zu einem dodecameren Komplex mit kubischer 23-Punktsymmetrie zusammen (Abb. 12 A und B), der einen äußeren Durchmesser von 60 Å und einen inneren Durchmesser von 23 Å besitzt. Das Innere des Komplexes wird dabei von den β -Faltblättern ausgekleidet, während sich die α -Helices sowie die Termini und die flexiblen β 2- β 3-Loops an der Oberfläche des Dodecamers befinden.

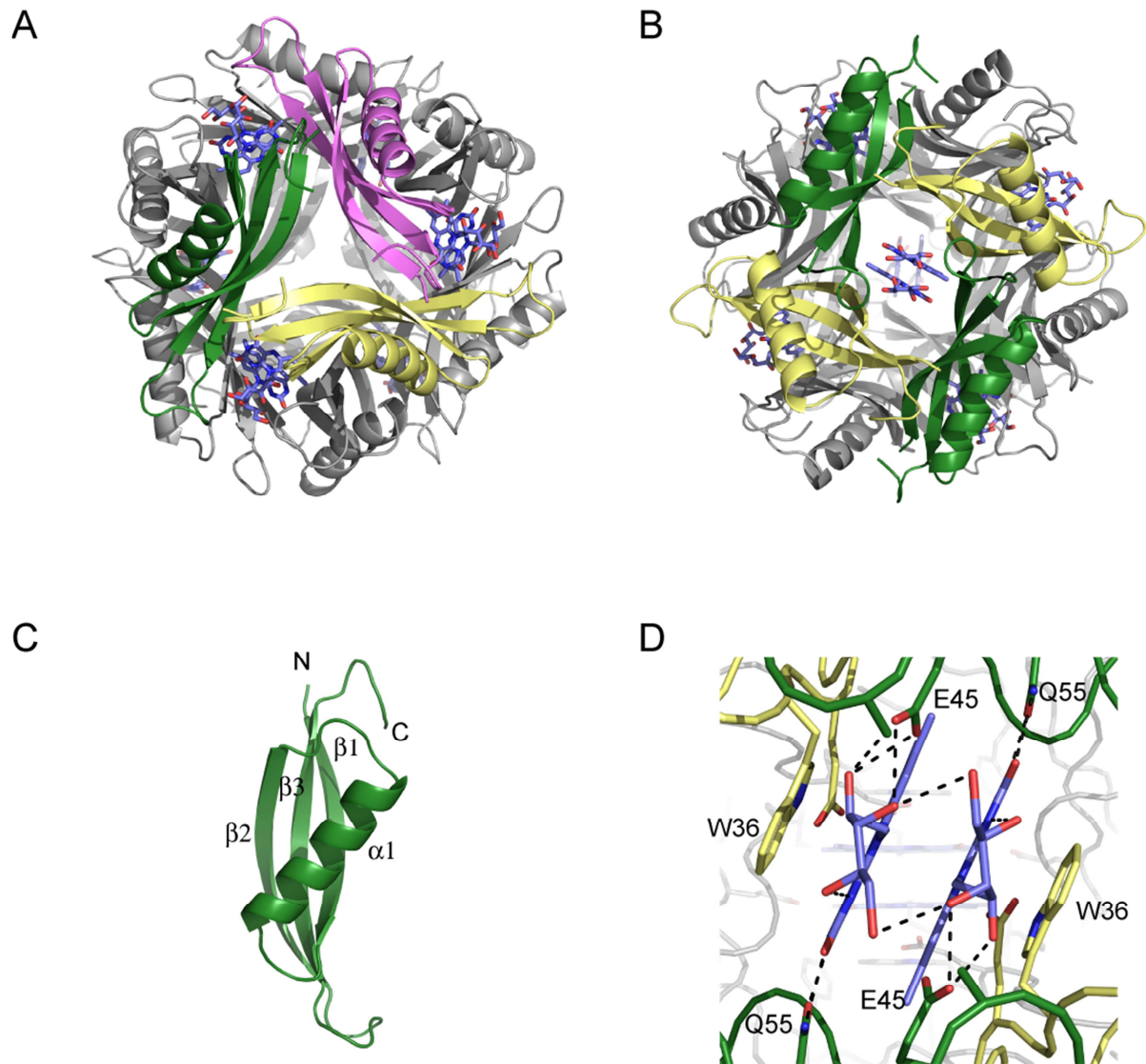


Abb. 12: Struktur des Dodecins aus *H. salinarum* [94]

A: Struktur des dodecameren Dodecinkomplexes mit Blick entlang der dreizähligen Achse, ein Trimer ist farblich abgehoben, Riboflavin-Dimere sind blau dargestellt.

B: Struktur des dodecameren Dodecinkomplexes mit Blick entlang der zweizähligen Achse auf die Riboflavin-Bindungsstelle; an der Riboflavinbindung beteiligte Untereinheiten sind farblich abgehoben, Riboflavin-Dimere sind blau dargestellt.

C: $\beta 1\alpha 1\beta 2\beta 3$ -Faltungsmotiv des *H. salinarum* Dodecinmonomers.

D: Darstellung der Riboflavinbindung im *H. salinarum* Dodecin. Interaktionen zwischen den Riboflavin-Molekülen (blau) und den an der Bindung beteiligten Aminosäuren sowie Interaktionen zwischen den beiden Riboflavinmonomeren sind schwarz gepunktet eingezeichnet.

Die Strukturen wurden anhand der in der RCSB-Proteindatenbank hinterlegten pdb-Datei 1mog mit PYMOL erstellt.

Die Riboflavin-Bindungstaschen befinden sich entlang der zweizähligen Achsen und werden von vier verschiedenen Untereinheiten gebildet (Abb. 12 D). Im Gegensatz zu bislang bekannten Flavoproteinen, die üblicherweise nur ein Flavinmolekül binden, sind hier die Flavine als Dimere gebunden. Die beiden Riboflavinmonomere weisen sich hierbei ihre *re-*

Seiten zu; an ihren *si*-Seiten befinden sich die Indolgruppen zweier Tryptophanreste, die den Dimer sandwichartig umgeben, so dass hier eine aromatische Tetrade gebildet wird. Stabilisiert werden die Flavine zusätzlich durch einige Wasserstoffbrückenbindungen zu den Resten Q55 und E45 sowie durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den beiden Ribitylseitenketten.

1.6.2 Vorkommen und Funktion von Dodecinen

Durch erste BLAST-Suchen konnten Dodecin-codierende Sequenzen auch in anderen Organismen wie den Eubakterien *Mycobacterium tuberculosis*, *Sinorhizobium meliloti*, *Brochiseptica pertussis*, *Bordetella brochiseptica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, *Clorobium tepidum*, *Geobacter sulfurreducens* und *Thermus thermophilus* gefunden werden. Dass teilweise das Dodecin in nicht unerheblichen Mengen gebildet wird, ist anhand des 2D-Geles des Proteoms von *M. tuberculosis* H37Rv zu sehen (<http://web.mpiib-berlin.mpg.de/cgi-bin/pdbs/2d-page/extern/overview.cgi?gel=16>), das an der für das Dodecin erwarteten Position einen deutlich sichtbaren Spot aufweist.

Die Funktion der Dodecine blieb längere Zeit unbekannt, da im *H. salinarum* kein Phänotyp für eine Dodecin-Deletionsmutante gefunden wurde und das Überleben des Organismus nicht unmittelbar von der Anwesenheit des Dodecins abhängig ist [94]. Somit stützt sich die Suche nach einer möglichen biologischen Funktion auf die strukturellen Daten sowie das Vorkommen in den Organismen. Bei den eubakteriellen Organismen, in denen das Dodecingen zunächst identifiziert wurde, handelte es sich hauptsächlich um Bakterien, die hohem oxidativen Stress ausgesetzt sind. Sei es, dass sie als pathogene Organismen unter dem Einfluss reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffspezies stehen, die von Makrophagen und Neutrophilen als Verteidigungsmechanismus eingesetzt werden [95]; oder dass sie als Bodenbakterien Radikalen ausgesetzt sind, die während verschiedenster Stoffwechselwege oder der Photosynthese entstehen. Somit könnte die Funktion der Dodecine in der zellulären Abwehr gegen reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies bestehen. Eine weitere mögliche Funktion der Dodecine wäre – in Analogie zu der Eisenspeicherung in Ferritinen – die Speicherung von Flavinen: freie Flavine, die aufgrund ihrer photosensitiven Eigenschaften schädlich für den Organismus wären, würden hier auf sehr kleinem Raum (ein Flavin pro 68 Aminosäuren) effektiv mit nur wenigen Bindungen stabilisiert und in bioverfügbarer Form gebunden. Des weiteren könnten Dodecine ähnlich wie die Blaulichtrezeptoren oder DNA-Photolyasen an Lichtsammelungsprozessen oder der DNA-Reparatur beteiligt sein; nicht

vollkommen auszuschließen ist auch eine Beteiligung der Dodecine an Redoxreaktionen, jedoch befindet sich das reaktive N5-Atom des Isoalloxazins im Inneren der Flavinbindungsstasche, so dass ein Zugang auf kleine Substrate beschränkt wäre.

Untersuchungen von Martin Grninger am *H. salinarum* Dodecin, die parallel zu dieser Arbeit durchgeführt wurden [96], weisen auf eine Flavinspeicherfunktion des archaebakteriellen Dodecins hin; er wies nach, dass in Analogie zu den RfBPs Riboflavin und seine Abbauprodukte Lumiflavin und Lumichrom in einer inaktiven Form gebunden und somit unkontrollierte Reaktionen freier Flavine unterdrückt werden.

1.7 Motivation und Zielsetzung

Bei dem durch *shot-gun* Kristallisation entdeckten Dodecin aus dem archaebakteriellen *H. salinarum* handelt es sich um das bislang kleinste Flavoprotein mit einem neuartigen Flavinbindungsmodus in Form einer aromatischen Tetrade. Eine biochemische Charakterisierung des Dodecins stand noch aus, so dass nicht klar war, ob es sich bei der dodecameren Anordnung und der gestapelten Flavinanordnung um die biologisch aktive Form handelt und welche Bedeutung sie für die Funktion des Proteins spielt. Ziel dieser Arbeit war demnach die Charakterisierung der Dodecine mit Schwerpunkt auf der Untersuchung der bislang einzigartigen Flavinbindung und der dodecameren Struktur. Die erhaltenen Ergebnisse sollten dazu dienen, Hinweise auf die biologische Funktion der Dodecine zu erhalten.

Als zu charakterisierende Zielproteine wurde die Dodecine aus *T. thermophilus* und *M. tuberculosis* gewählt. Bei ersterem handelt es sich um ein Protein aus einem thermophilen eubakteriellen Organismus, von dem man sich eine leichte Handhabbarkeit aufgrund der thermophilen Eigenschaften erhoffte; bei letzterem handelt es sich um ein Dodecin aus einem pathogenen Bakterium, von dem bekannt war, dass es in diesem in hohen Konzentrationen vorlag.

Die Dodecine dieser Organismen sollten in *E. coli* heterolog exprimiert, aufgereinigt und biochemisch, spektroskopisch und röntgenkristallographisch charakterisiert werden. Mit diesen Arbeiten wurde bereits während der Diplomarbeit begonnen. Damals gaben erste Ergebnisse bereits einen Hinweis auf Unterschiede zwischen dem *T. thermophilus* Dodecin und dem *H. salinarum* Dodecin bezüglich der Präferenz des gebundenen Flavins sowie im Flavinbindungsmodus, so dass unter anderem in dieser Arbeit durch Mutationen der an der Flavinbindung beteiligten Aminosäurereste geklärt werden sollte, welchen Einfluss die

entsprechenden Reste auf die Präferenz des gebundenen Flavins und den Bindungsmodus besitzen. Des Weiteren sollten in dieser Arbeit Mutanten des an der Ausbildung der aromatischen Tetrade beteiligten Tryptophanrestes hergestellt werden, um Rückschlüsse auf den Einfluss des Tryptophans auf Eigenschaften wie etwa die Reduzierbarkeit oder spektroskopische Charakteristika ziehen zu können. Hierbei sollten Methoden wie EPR-Spektroskopie und Ultrakurzzeitspektroskopie zum Einsatz kommen.

Zur Untersuchung der Funktion sollten außerdem Dodecin-*knockout*-Mutanten in *Pseudomonas aeruginosa* hergestellt werden und diese mittels verschiedener Phänotypentests untersucht werden. Ein Schwerpunkt der Untersuchung sollte hier auf der Untersuchung des Verhaltens der *knockout*-Mutante gegenüber radikalischem Stress gelegt werden. Des Weiteren sollte anhand eines biologischen Modells der Einfluss des Dodecine auf die Pathogenizität des Organismus untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte

Tab. 1: Verwendete Geräte

Gerät	Typenbezeichnung und Hersteller
ÄKTATMpurifier 100	Pumpen P-900, Fraktionskollektor Frac-950, Monitor UV-900, Leitfähigkeits- und pH-Zelle pH/C-900, Software Unicorn 4.10 (<i>GE Healthcare</i> , Freiburg)
Agarosegel-Dokumentationsapparatur	Computer, Kamera (<i>UVP</i> , England), UV-Schirm (<i>Herolab</i> , Wiesloch), Drucker UP-D895 (<i>Sony</i> , Berlin)
Autoklav	T-Line TM (<i>Fedegari</i> , Albuzzano, Italien), (<i>Webeco</i> , Bad Schwartau)
Brutschrank	(<i>Heraeus</i> , Hanau)
CD-Spektropolarimeter	J-810 mit PTC-423S Peltier-Element (<i>Jasco</i> , Groß-Umstadt)
Diaprojektor	Perkeo Royal AF selektiv IR (<i>ZETT</i> , Braunschweig) mit 250 W Lampe Typ 64655 (<i>Osram</i> , München)
Digitalkamera	PowerShot A70 (<i>Canon</i> , Krefeld)
Dioden-Array-Spektrometer	HP 8453 Dioden-Array-Spektrometer (<i>Hewlett Packard</i> , Palo Alto, USA)
DNA-Sequenzer	ABI Prism 310 Genetic Analyser, (<i>Perkin Elmer</i> , Waltham, USA)
Dokumentationssystem für Kristallisationsscreens	CrystalPro HT 110 (<i>TriTek Corporation</i> , Sumerduck, USA)
Elektroporator	MicroPulser (<i>Biorad</i> , München)
EPR-Gerät	EMX-6/1 X-Band-EPR-Spektrometer (<i>Bruker</i> , Karlsruhe) mit EMX113 Konsole; ER-041 X-Band Mikrowellenbrücke mit eingebautem ER-041-1161 Mikrowellen-Frequenzzähler; EMX-1101

	Magnet & Power-Supply bestehend aus: ER-070 6-inch Magnet mit 60 mm Luft-Spalte, EMX-080 1 kWatt Magnet Power-Supply; EMX-032T Hall-Feld-Sonde mit Elektronik zur Regelung des Magneten; Bruker Finger Dewar für Flüssig-Stickstoff (ER 167FDS-Q).
Fluoreszenz-Spektropolarimeter	FP-6500 Spectrofluorometer mit PTL-423S Peltier Element (<i>Jasco</i> , Groß-Umstadt)
FPLC-System	Fraktionskollektor FRAC-100, Gradienten-Programmierer GP-250 Plus, Pumpen P-500, Single-Path-Monitor UV-1 optische Einheit, Kontrolleinheit, Schreiber REC 111 (<i>GE Healthcare</i> , Freiburg)
French-Press	French-Pressure Cell Press 5.1 (<i>Sim Aminco</i> , Urbana, USA), 20 k Rapid-fil cell (40 mL)
Gel-Elektrophorese-Zubehör	Agarosegel-Elektrophorese-Apparaturen (<i>Feinmechanik</i> Universität Marburg), SDS-Elektrophorese-Apparaturen Mighty Small II SE250 (<i>Hoefer Scientific</i> , San Francisco, USA) Spannungsquelle EPS 300 (<i>GE Healthcare</i> , Freiburg)
Homogenisator	EmulsiFlex-C5 (<i>Avestin</i> , Ottawa, Kanada)
HPLC- und MS-Systeme	1100 Series (<i>Agilent Technologies</i> , Waldbronn), Q-Star Pulsar (<i>Applied Biosystems</i> , Foster City, USA)
ITC-Gerät	MCS-ITC System (<i>MicroCal</i> , Northampton, USA)
Kristallisationsroboter	Cartesian Microsys TM SQ4000 (<i>Genomic Solutions</i> , Huntingdon, GB), LISSY (<i>Zinsser Analytic</i> , Frankfurt)
Mikroskop	B601 (<i>Olympus</i> , Hamburg), MZ8 (<i>Leica</i> , Wetzlar)
PCR-Maschine	Gene Amp PCR System 2400 (<i>Perkin Elmer</i> , Waltham, USA)
pH-Meter	Basic Meter PB-11 (<i>Sartorius</i> , Göttingen), Digital pH-Meter pH525 (<i>wtw</i> , Weilheim)
Pipetten	Research variabel (<i>Eppendorf</i> , Hamburg)
Reinstwasseranlage	Seral Seralpur Pro90CN (<i>Seral</i> , Celle)
Röntgendiffraktometer	Drehanode AXS FR591 (<i>Bruker</i> , Karlsruhe)

Schüttelinkubatoren	Detektor MAR345 dtb (<i>MAR Research</i> , Norderstedt), Cryokühlung (<i>Oxford Cryosystems</i> , Oxford, GB) (<i>New Brunswick</i> , New York, USA), TH25 (<i>Edmund Bühler</i> , Hechingen),
Spektralphotometer	U-2000 Spektrophotometer (<i>Hitachi</i> , Tokio, Japan), Ultrospec 3100 (<i>GE Healthcare</i> , Freiburg)
Thermomixer	Comfort (<i>Eppendorf</i> , Hamburg)
Ultraschallgerät	Sonoplus HD 200 (<i>Bandelin electronic</i> , Berlin)
Waagen	DeltaRange® PC2200 (<i>Mettler-Toledo</i> , Gießen), LabStyle (<i>Mettler-Toledo</i> , Gießen)
Zentrifugen	Tischzentrifuge 5417C (<i>Eppendorf</i> , Hamburg), Kühl- Tischzentrifuge 13R (<i>Heraeus</i> , Hanau) Kühlzentrifuge J2-HS (<i>Beckmann</i> , Krefeld) mit JA- 10-Rotor und JA-20-Rotor, Falkontube-Zentrifuge 5910 (<i>Eppendorf</i> , Hamburg))

2.1.2 Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterialien

Chemikalien wurden üblicherweise von den Firmen *Fluka/Sigma Aldrich* (München), *Merck* (Darmstadt) oder *Roth* (Karlsruhe) mindestens in der Reinheitsstufe *p.a.* bezogen. Für Kristallisationsansätze wurden Chemikalien von *Fluka* (München) in der Reinheitsstufe *BioChemika Ultra* oder *p.a.* verwendet. Die für die molekularbiologische DNA-Präparation und -Aufreinigung benötigten Kits wurden von der Firma *QIAGEN* (Hilden) bezogen. Säulenmaterialien und -zubehör stammten von der Firma *GE Healthcare* (Freiburg).

Tab. 2: Verwendete Materialien

Material	Hersteller
Agarose	<i>Invitrogen Ltd.</i> (Paisley, UK)
Ampicillin	<i>Applichem GmbH</i> (Darmstadt)
Bacto-Hefeextrakt	<i>Difco Laboratories</i> (Detroit, USA)
Bacto-Trypton	<i>Difco Laboratories</i> (Detroit, USA)
Bradfordlösung	<i>Biorad GmbH</i> (Hamburg)
(Protein Assay Farbstoff-	

konzentrat)	
BCA TMProteinAssay Kit	<i>Pierce /Thermo</i> (Rockford, IL, USA)
BSA	<i>Applichem GmbH</i> (Darmstadt)
Coomassie Brilliant Blue G-250	<i>Serva Electrophoresis GmbH</i> (Heidelberg)
Dialysecassetten <i>Slide-A-Lyzer</i>[®], 3.5 kDa	<i>Pierce /Thermo</i> (Rockford, IL, USA)
Dialysemembran <i>Snake-Skin</i>TM, 3.5 kDa	<i>Pierce /Thermo</i> (Rockford, IL, USA)
DNA-Marker <i>peqGOLD Range Mix</i>	<i>peQLab Biotechnologie GmbH</i> (Erlangen)
DNA-Leiter <i>Mass Ruler</i>TM <i>DNA Ladder High Range</i>	<i>Fermentas</i> (St. Leon-Rot)
DNA-Polymerase, <i>Expand</i>TM <i>Long Template PCR System</i>	<i>Boeringer Mannheim GmbH</i> (Mannheim)
DNA-Polymerase, <i>Phusion High-fidelity</i>	<i>New England Biolabs</i> (Frankfurt)
DNA-Polymerase, <i>Platinum</i>[®] <i>TaqDNA Polymerase High fidelity</i>	<i>Invitrogen Ltd.</i> (Paisley, UK)
dNTP-Mix, <i>peqGOLD</i>	<i>peQLab Biotechnologie GmbH</i> (Erlangen)
dNTP-Mix	<i>Fermentas</i> (St. Leon-Rot)
Einmalküvetten	<i>Sarstedt</i> (Nümbrecht)
Elektroporationsküvetten	<i>VMR</i> (Darmstadt)
Gentamycin	<i>Applichem GmbH</i> (Darmstadt)
IPTG	<i>Gerbu</i> (Gaiberg)
Kalibrierkit für die Größenausschlusschromatographie	<i>GE Healthcare</i> (Freiburg)
Kanamycin	<i>Applichem GmbH</i> (Darmstadt)
Konzentratoren <i>Amicon</i>[®] <i>Ultra</i>	<i>Millipore</i> (Bad Schwalbach)
Kristallisationsscreens	
<i>Crystallization Basic Kit</i>	<i>Sigma</i> (München)
<i>Crystallization Extension Kit</i>	
<i>Crystallization Cryo Kit</i>	
<i>Nextal Classic Suite</i>	<i>NeXtal/QIAGEN</i> (Hilden)
<i>Nextal Classic Lite Suite</i>	
<i>Nextal Anions Suite</i>	

Kristallisationszubehör

Platten:

Deckgläser Ø 22 mm

24well crystallization tool

24well VDX-Platte

96well Crystal Quick™ Platte

96well Innovaplate™ SD-2

SilverSeal Klebefolie

VIEWseal™ Klebefolie

Cryoschleifen:

CrystalCap™ Coloured

CrystalCap HT™

Mounted Cryo Loops

Micro Mounts

Lysozym

Mutagenese-Kit, QuikChange®

Site-directed mutagenesis kit

Protein-Marker, peqGOLD

Protein-Marker, Unstained Protein

Molecular Weight Marker

Restriktionsenzyme

SDS

Spritzenvorsatzfilter, Filtropur S

0.2

Sterilfilter, Ultrafree® MC

T4 DNA-Ligase

Xylenxanol FF

Hampton Research (Aliso Viejo, USA)

NeXtal/QIAGEN (Hilden)

Hampton Research (Aliso Viejo, USA)

Greiner Bio-one (Frickenhausen)

InnovadyneTechnologies, Inc. (Santa Rosa, USA)

Greiner Bio-one (Frickenhausen)

Greiner Bio-one (Frickenhausen)

Hampton Research (Aliso Viejo, USA)

Hampton Research (Aliso Viejo, USA)

Hampton Research (Aliso Viejo, USA)

MiTeGen (Ithaca, NY, USA)

Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim)

Stratagene (Cedar Creek, TX, USA)

peqLab Biotechnologie GmbH (Erlangen)

Fermentas (St. Leon-Rot)

New England Biolabs (Frankfurt)

Merck (Darmstadt)

Sardstedt (Nümbrecht)

Millipore (Bad Schwalbach)

New England Biolabs (Frankfurt)

Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg)

2.1.3 Vektoren

2.1.3.1 pET-28a(+)

Der pET-28a(+)-Vektor [97-99] wurde als Standardvektor für Klonierungs- und Expressionsexperimente benutzt.

In pET-Vektoren findet die Transkription des zu exprimierenden Gens durch die T7-RNA-Polymerase statt, die vom Expressionsstamm zur Verfügung gestellt wird. Die Kontrolle erfolgt dabei durch den *lac*-Repressor, der an den im Promotorbereich des zu exprimierenden Gens enthaltenen *lac*-Operator bindet und damit die Transkription durch die T7-RNA-Polymerase verhindert. Durch Zugabe von IPTG wird zum einen der Repressor inaktiviert, zum anderen aber wird auch das *lacUV5*-Operatorgen im Expressionsstamm durch IPTG induziert, infolge dessen die T7-RNA-Polymerase exprimiert wird.

Da Klonierungsstämme üblicherweise neben bakterieller RNA-Polymerase keine T7-RNA-Polymerase enthalten, findet während der Klonierung nahezu keine Transkriptionsaktivität statt.

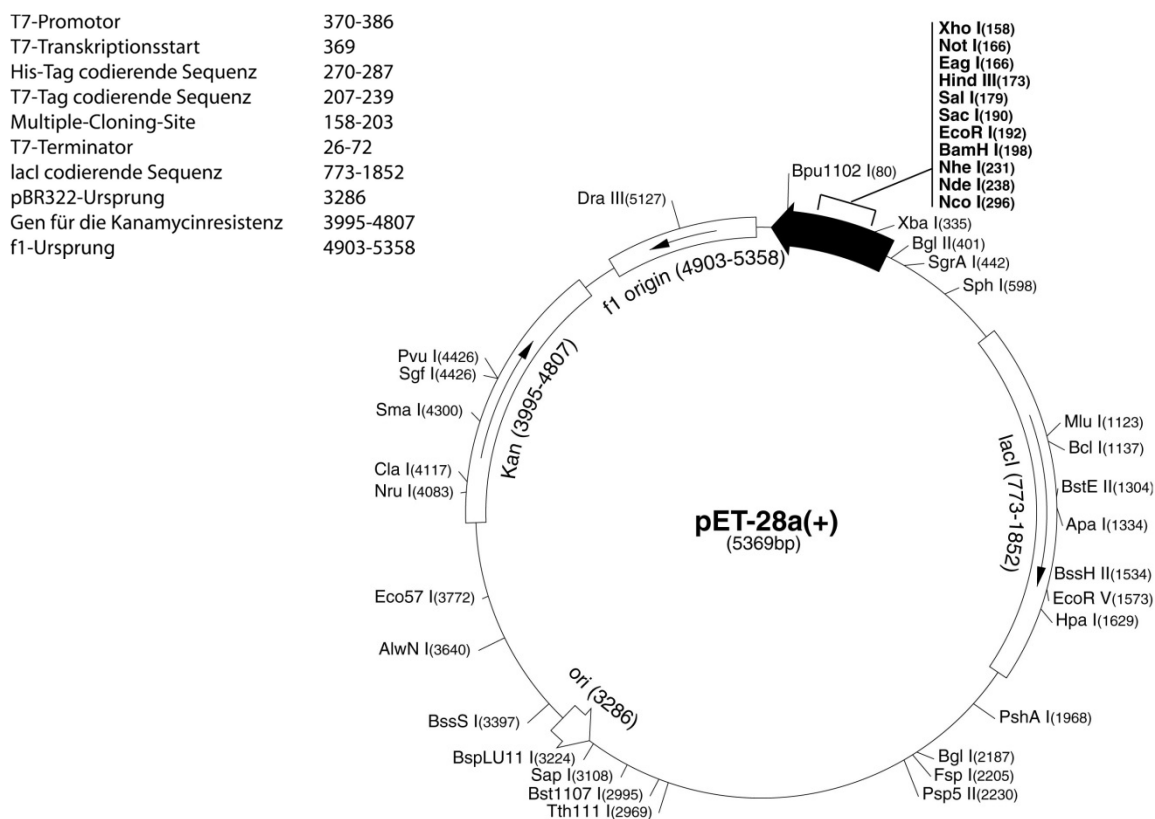


Abb. 13: Vektorkarte des pET-28a(+)

2.1.3.2 pEX18Ap

Relevanter Genotyp: Ap^R *oriT* *sacB*

Der Vektor pEX18Ap [100] ist ein *gene-replacement* Vektor, der für die Klonierung des Knockout-Vektors pΔDodecin verwendet wurde. Neben dem Ampicillinresistenz verleihenden *bla* Gen, dem *lacZα*-Allel für *Blue-white screening* auf X-Gal-haltigem Medium und einem *oriT* für Konjugations-vermittelnden Plasmidtransfer enthält er außerdem den Selektionsmarker *sacB*. Das *sacB* Gen codiert für das Enzym Levansucrase (6-β-D-fructosyltransferase), das die Hydrolyse von Saccharose (engl. Sucrose, 2,6-β-D-Fructan) und die Synthese des Fructosepolymers Levan katalysiert [101].

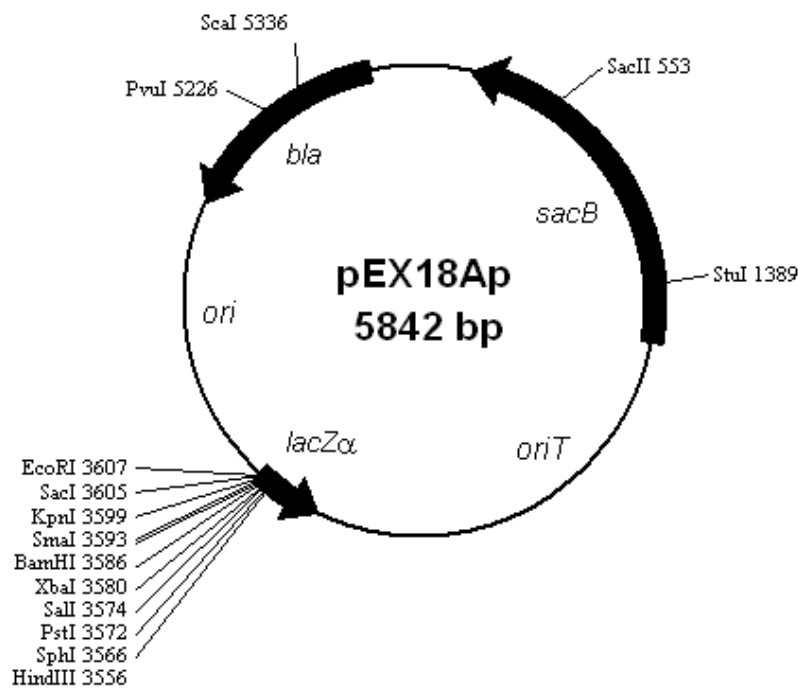


Abb. 14: Vektorkarte des *gene-replacement*-Vektors pEX18Ap

2.1.4 Biologisches Material

2.1.4.1 *E. coli* DH5α

Genotyp: F ϕ 80*lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)* U169 *recA1 endA1 hsdR17* (*r_k*⁻, *m_k*⁺) *phoA supE44λ thi⁻1 gyrA96 relA1* [102].

Der DH5α-Stamm ist ein Laborstamm, der vielseitig Anwendung findet. Mit seinem *recA1*-Phänotyp sorgt er für eine erhöhte Insertstabilität, die *endA1*-Mutation ist verantwortlich für

eine hohe Qualität und Ausbeute der durch Miniplasmidpräparation erhaltenen Plasmid-DNA. So liegt die Effizienz dieses Stammes bei $1 \cdot 10^6$ - $1 \cdot 10^9$ Transformanden/ μg DNA. Zusätzlich erlaubt der *lacZ* Δ *M15*-Phänotyp ein *Blue-white screening* der rekombinant erhaltenen Klone [www. Invitrogen.com].

Elektrokompetente *E. coli* DH5 α -Zellen (*Invitrogen Ltd.*) wurden zur Transformation von Ligationsansätzen und zur Vervielfältigung von Plasmiden verwendet.

2.1.4.2 *E. coli* XL1-Blue Superkompetente Zellen

Genotyp: *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [*F'* *proAB lacI^qZ* Δ *M15 Tn10* (*Tet^r*)].

Dieser hitzekompetente Stamm besitzt eine hohe Transformationseffizienz ($1 \cdot 10^9$ Transformanden/ μg DNA) und erlaubt das *Blue-white screening* richtiger Kolonien. Der *endA*-Phänotyp sorgt für die Präparation hochqualitativer Plasmid-DNA [www. stratagene.com].

Hitzekompetente XL1-Blue superkompetente Zellen (*Stratagene*) dienen als Klonierungstamm bei der ortsspezifischen Mutagenese.

2.1.4.3 *E. coli* BL21-Gold(DE3)

Genotyp: B *F* *ompT hsdS*(*r_B⁻ m_B⁻*) *dcm⁺ Tet^r gal* λ (*DE3*) *endA Hte*

BL21-Gold(DE3)-Zellen enthalten chromosomal eine Kopie des Gens für die T7-RNA-Polymerase und werden daher in Kombination mit Vektoren, die den T7-RNA-Promotor besitzen, verwendet. Das Gen für die T7-RNA-Polymerase steht unter Kontrolle des *lacUV5*-Promotors, der durch IPTG induzierbar ist. BL21-Gold(DE3)-Zellen enthalten weder *OmpT*- und *Lon*-Proteasen, die eine Isolation des intakten Proteins erschweren können, noch das *Endonuclease I*-codierende Gen, das für eine geringe Plasmid-DNA Ausbeute sorgt. Der *Hte*-Phänotyp steigert die Transformationseffizienz [www. stratagene.com].

Hitzekompetente BL21-Gold(DE3)-Zellen (*Stratagene*) wurden als Expressionstamm verwendet.

2.1.5 Primer

Eine vollständige Liste aller verwendeten Primer befindet sich im Anhang 5. Alle dort aufgeführten Primer wurden bei *Invitrogen* als lyophilisiertes Pulver in *desalted* Qualität bestellt.

2.1.6 Medien

Zum Gießen von Kulturplatten wurde dem Medium vor dem 30-minütigen Autoklavieren bei 121 °C und 1.5 bar 15 g Agar pro Liter Kulturmedium zugegeben. Die als Selektionsmarker verwendeten Antibiotika wurden erst nach Abkühlung auf ca. 55 °C zugegeben. Sofern nicht anders angegeben, beziehen sich die zugegebenen Mengen auf einen Liter Medium.

Folgende Medien wurden zur Anzucht von *E. coli* verwendet:

LB-Medium (lysogeny broth) [103]

10 g Bacto-Trypton
5 g Bacto Yeast Extrakt
10 g NaCl
0.4 mL 10 M NaOH

TB-Medium (terrific broth) [103]

12 g Bacto Trypton
24 g Hefe Extrakt
4 mL Glycerin
Lösen in 900 mL dest. H₂O, autoklavieren, vor Gebrauch zusammengeben mit 100 mL autoklavierter Pufferlösung bestehend aus
0.17 M KH₂PO₄
0.72 M K₂HPO₄

NZY⁺-Medium

10 g NZ amin (Casein Hydrolysat)
5 g Hefe-Extrakt
5 g NaCl
pH-Wert mit NaOH auf 7.5 einstellen, autoklavieren
vor Gebrauch versetzen mit
12.5 mL 1 M MgCl₂
12.5 mL 1 M MgSO₄
20 mL 20 % Glucose

Zur Anzucht der *P. aeruginosa*-Kulturen diene LB^{*}-Medium, LB^{*}-Nitrat- oder AB-Medium.

LB^{*}-Medium

10 g Bacto-Trypton
5 g Hefe
5 g NaCl

LB^{*}-Nitrat-Medium

10 g Trypton
5 g Hefe
5 g NaCl
5 g KNO₃

AB-Medium

100 mL A10
0.5 mL FeSO₄·7 H₂O
1 mL Trace metals
20-40 mM C-Quelle
0.1 mM CaCl₂
0.1 mM MgCl₂

AB-Platten (200 mL)

180 mL Agar-Wasser
20 mL A10
100 μL $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$
4 mL 1 M Glucoselösung
20 μL 1 M CaCl_2 -Lösung
200 μL 1 M MgCl_2
200 μL Trace Metals

A10-Medium

20 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
90 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$
30 g KH_2PO_4
30 g NaCl

Trace metals

200 mg $\text{CaSO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$
200 mg $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$
20 mg $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
20 mg $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$
20 mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$
10 mg $\text{NaMoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
5 mg H_3BO_3

Agar-Wasser

3 g Agar
Mit bd H_2O auf 180 mL auffüllen

2.1.7 Antibiotika-Stammlösungen

Antibiotika-Stammlösungen wurden in 1000-facher Endkonzentration in bidestilliertem Wasser angesetzt, sterilfiltriert und bei -20°C aufbewahrt.

Antibiotikum	Endkonzentration
Ampicillin	50 µg/mL
Kanamycin	35 µg/mL
Gentamycin	15 µg/mL

2.1.8 Puffer

Bei der Expression und Aufreinigung von rekombinanten Proteinen wurden folgende Puffer verwendet:

AM-Puffer
20 mM Tris/HCl, pH 8.0; 200 mM NaCl
Puffer A
20 mM Tris/HCl; pH 8.0
Puffer B
20 mM Tris/HCl; pH 8.0, 100 mM NaCl
Puffer C
20 mM Tris/HCl; pH 8.0, 1 M NaCl
Puffer D
20 mM Tris/HCl; pH 8.0, 0.5 M NaCl
Puffer E
6 M Guanidiniumchlorid, 20 mM Tris/HCl, pH 8.0; 100 mM NaCl

2.2 Molekularbiologische Methoden

Die mit dem Mikroorganismus *E. coli* durchgeführten Arbeiten wurden gemäß Gentechnikgesetz (GenTG) vom 20.06.1990 durchgeführt und fielen unter die Sicherheitsstufe S1. Alle beim Arbeiten mit Bakterien kontaminierten Laborgefäße und Lösungen wurden autoklaviert (60 min, 121 °C, 1.5 bar) oder über Nacht mit Virkon (*Tetenal*) inaktiviert.

2.2.1 PCR

Die PCR ist eine Methode zur Amplifizierung beliebiger Nucleinsäureabschnitte *in vitro* [104], sofern die Sequenzen der benachbarten Bereiche bekannt sind. Die PCR macht sich die Eigenschaft von DNA-Polymerasen aus thermophilen Organismen zunutze, DNA bei hohen Temperaturen zu duplizieren. Verwendet wurde in dieser Arbeit der Expand™ Long Template PCR-Kit (*Böhringer Mannheim*), die Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity (*Invitrogen*) und die Phusion™ High fidelity DNA Polymerase (*NEB*).

Das Expand™ Long Template PCR-Kit enthält sowohl eine Taq- als auch eine Pwo-Polymerase. Dabei sorgt die Taq-Polymerase für hohe Temperaturstabilität, die Pwo-Polymerase besitzt neben der 5'-3'-Polymeraseaktivität auch eine 5'-3'-Exonucleaseaktivität; durch diese *proof-reading*-Eigenschaft wird die Fehlerrate der Replikation erheblich herabgesetzt. Bei der Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity handelt es sich um einen Enzymmix aus hitzestabiler Taq DNA Polymerase, einer *Pyrococcus* GB-D-Polymerase, die aufgrund ihrer 3'-5' Exonucleaseaktivität eine hohe *proof-reading* Eigenschaft besitzt, und einem Platinum® Taq Antikörper zur Unterbindung der Polymeraseaktivität bei Raumtemperatur. Bei der Phusion™ High fidelity DNA Polymerase handelt es sich um eine *Pyrococcus*-ähnliche Polymerase mit hoher 3'-5' Exonucleaseaktivität.

Die DNA-Amplifikation erfolgt in drei Schritten: Zunächst wird die Templat-DNA zur Auftrennung in Einzelstränge auf 92-98 °C erhitzt. Dann erfolgt ein schnelles Abkühlen auf die spezifische Hybridisierungstemperatur, bei der eine Anlagerung der Primer an die Templat-DNA stattfindet. Diese spezifische Hybridisierungstemperatur ist abhängig von GC-Gehalt und Länge der Primer und wird berechnet nach:

$$T = 59.9 + 41 \cdot GC\text{Anteil} - (675 / \text{Primerlänge})$$

Danach wird die Temperatur auf 68-72 °C erhöht. Diese Temperatur ist optimal für die Taq-Polymerase und gewährleistet die rasche Elongation der Primer. Die Elongationszeit richtet

sich nach der Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragments, bei langen DNA-Fragmenten kann die Elongationszeit entsprechend verlängert werden.

Nach der Elongation wird der Reaktionsansatz wieder auf hohe Temperaturen gebracht, um die DNA wieder in ihre Einzelstränge zu zerlegen. Üblicherweise werden 25-35 Zyklen durchlaufen.

Typische Reaktionsansätze unter Verwendung der jeweils aufgeführten Polymerasen enthielten:

Expand™ Long Template PCR-Kit	Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity	Phusion™ High fidelity DNA Polymerase
0.2-0.5 µL Templat-DNA	1 µL Templat-DNA	1 µL Templat DNA
2 µL 3'-5'-Primer (10 pmol/µL)	1 µL 3'-5'-Primer (10 pmol/µL)	1.5 µL 3'-5'-Primer (10 pmol/µL)
2 µL 5'-3'-Primer (10 pmol/µL)	1 µL 5'-3'-Primer (10 pmol/µL)	1.5 µL 5'-3'-Primer (10 pmol/µL)
1 µL dNTP-Mix (10 mM)	1 µL dNTP-Mix (10 mM)	1.5 µL dNTP-Mix (10 mM)
0.5 µL DMSO	2.5-5 µL DMSO	5 µL DMSO
2.5 µL 10 x Puffer P3	5 µL 10 x Puffer	10 µL 5 x HF-Puffer
	0.2 µL Polymerase (1 Unit)	0.5 µL Polymerase
Ad 25 µl bd H ₂ O	Ad 50 µL bd H ₂ O	Ad 50 µL bd H ₂ O
0.2 µL Polymerase (0.7 Units) bei 94 °C		

Üblicherweise wurde ein Gene Amp PCR System 2400 (*Perkin Elmer*) verwendet. Dabei wurden folgende Temperaturprofile gewählt:

Expand™ Long Template PCR-Kit	Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity	Phusion™ High fidelity DNA Polymerase
94 °C* 5 min	94 °C* 2 min	98 °C* 30 s
94 °C* 1 min	94 °C* 30 s	98 °C* 10 s
54 °C# 30 s 30 Zyklen	50-54 °C# 30 s 30 Zyklen	57-60 °C# 20 s 35 Zyklen
68 °C* 20 s	68-72 °C* 80s-7 min	72 °C* 30 s
68 °C* 8 min	68-72 °C* 7-10 min	72 °C* 8 min
4 °C ∞	4 °C ∞	4 °C ∞

*Polymerase-abhängig, #Primer-abhängig

2.2.2 DNA-Präparation aus PCR-Ansätzen

Um eine Beeinträchtigung der nachfolgenden Schritte durch Verunreinigung der amplifizierten DNA aus PCR-Ansätzen (Enzyme, Salze, Nucleotide, Primer, Templat-DNA) zu vermeiden, ist eine Aufarbeitung der PCR-Reaktionsansätze notwendig. Enzyme, Salze und kleinere DNA-Fragmente bis zu einer Länge von 40 Nukleotiden können mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kits (*QIAGEN*) entfernt werden. Hier wird die DNA in Anwesenheit von hohen Salzkonzentrationen und niedrigem pH-Wert an eine Silica-Membran gebunden [105], während Kontaminationen nicht adsorbiert werden. Daraufhin werden die Verunreinigungen gewaschen und die an die Säule gebundene DNA mit Niedrigsalzpuffer eluiert.

Der aufzureinigende Ansatz wurde mit dem fünffachen Volumen Bindepuffer (PB-Puffer) versetzt. Die Mischung wurde dann auf die QIAquick Spin Säule aufgetragen, 5 min bei RT inkubiert und in einer Tischzentrifuge zentrifugiert (60 s, 5000 rpm, RT). Der Durchfluss wurde verworfen und die Matrix mit 750 µL Waschpuffer (PE-Puffer) 5 min bei RT inkubiert. Es wurde 60 s bei 5000 rpm zentrifugiert, der Durchfluss verworfen und dann ein weiteres Mal bei 13000 rpm für 60 s zentrifugiert. Die Matrix wurde 5 min bei 37 °C im Heizblock getrocknet. Nach Auftragen von 50 µL auf 50 °C vorgewärmtem Elutionspuffer (EB-Puffer) wurde 5 min bei RT inkubiert und die DNA durch 60-sekündige Zentrifugation bei 13000 rpm eluiert.

EB-Puffer
10 mM Tris/HCl, pH 8.5

2.2.3 Hydrolytische Spaltung mit Restriktionsendonukleasen

Zur hydrolytischen Spaltung doppelsträngiger DNA wurden Restriktionsendonucleasen des Typs II verwendet, die unterschiedliche palindromische Sequenzen erkennen und spalten können. Je nach Enzym entstehen glatte Enden (*blunt ends*) oder solche mit einem definierten Überhang (*sticky ends*).

Zur hydrolytischen Spaltung wurden ca. 1 µg DNA mit etwa 5 Units des jeweiligen Enzyms im vom Hersteller mitgelieferten Puffer umgesetzt; sofern erforderlich, wurde außerdem BSA zugesetzt. Die Inkubationszeit betrug 2 h bei 37 °C für Kontrollverdaue, präparative Verdaue wurden mindestens 3 h inkubiert.

2.2.4 Hitzeinaktivierung

Nach einem präparativen Verdau von PCR-Fragmenten oder Vektoren wurde der Reaktionsansatz zur Inaktivierung der Restriktionsenzyme im Heizblock 20 min bei 65 °C erwärmt.

2.2.5 CIP-Verdau

Um die Religation des Vektors zu verhindern, wurde der Vektor nach Restriktionsverdau und Hitzeinaktivierung der verwendeten Restriktionsendonukleasen mit dem Enzym Alkaline Phosphatase, Calf Intestinal (CIP) verdaut. Dieses Enzym katalysiert den Abbau der 5'Phosphatgruppe von DNA, sowie Ribo- und Desoxyribonukleosidtriphosphaten. Durch das Fehlen des 5'Phosphoryl-Terminus, der zur Ligation notwendig ist, können CIP-verdaute Fragmente nicht religieren [103].

Zu 50 µL hitzeinaktiviertem Restriktionsansatz wurden 1 µL CIP (*NEB*, 10000 Units/mL) gegeben und 1 h bei 37 °C inkubiert. Da die CIP in den meisten *NEB* Puffern aktiv ist, ist eine Umpufferung oft nicht notwendig.

2.2.6 Agarosegelelektrophorese

Die analytische Agarosegelelektrophorese wurde verwendet, um DNA-Fragmente aufzutrennen und anhand eines Vergleiches mit einem Standard deren Größe und Konzentration zu bestimmen. Darüber hinaus können nach einem präparativen Verdau Verunreinigungen wie Salze, Nucleotide sowie unerwünschte DNA-Fragmente durch präparative Agarosegelelektrophorese abgetrennt werden.

Standardmäßig wurden 1 % (w/v) Agarosegele verwendet; zur Trennung besonders kleiner Fragmente wurden 1.5 % Gele, zur Trennung großer Fragmente 0.7 % Gele benutzt.

Dazu erhitze man die Agarose in 1 x TBE-Puffer, bis sich diese vollständig gelöst hatte. Nach dem Abkühlen auf etwa 50 °C wurde das flüssige Gel in eine Elektrophoresekammer mit zuvor eingesetztem Kamm gegossen und nach dem Aushärten mit 1 x TBE-Puffer überschichtet. Die DNA-Proben wurden im Verhältnis 1:5 (v/v) mit 6 x Probenpuffer versetzt und in die Taschen pipettiert. Als Größenstandard diente die *peqGOLD* Range Mix DNA-Leiter von *peQLab* oder der *Mass Ruler*TM DNA Ladder High Range von *Fermentas*. Die Elektrophorese wurde bei analytischen Agarosegelen bei einer Stromstärke von 100 mA durchgeführt, bei präparativen Gelen bei 80 mA. Nach der Elektrophorese wurde das Gel für 15 min in einem Ethidiumbromidbad angefärbt. Die mit Ethidiumbromid angefärbten DNA-

Banden wurden bei UV-Licht als fluoreszierende Banden sichtbar und konnten photographiert bzw. ausgeschnitten werden.

10 x TBE
1 M Tris
1 M Borsäure
20 mM EDTA

6 x DNA-Probenpuffer
0.25 % (w/v) Xylenylnol FF
1.5 % Ficoll Typ 400

Ethidiumbromidlösung
200 mL dest. H ₂ O
200 µg Ethidiumbromid

2.2.7 Isolierung und Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Aufreinigung der ausgeschnittenen Gelfragmente erfolgte nach dem QIAquick Gel Extraktions Kit-Protokoll von *QIAGEN*. Hierbei wird die DNA unter Hochsalzbedingungen an der Silicagelmembran einer Säule gebunden und unter Niedrigsalzbedingungen wieder von der Säule eluiert.

Das isolierte Gelstück wurde mit 300 µL Puffer QG pro 100 mg Gel in einem 2 mL-Reaktionsgefäß versetzt und 10 min bei 50 °C inkubiert, bis sich die Agarose vollständig gelöst hatte. Die gelbe Lösung wurde dann mit einem Gelvolumen Isopropanol versetzt, gemischt und auf die QIAquick Spin Säule gegeben. Die Bindung der DNA an die Säule erfolgte durch 5-minütige Inkubation bei RT und Zentrifugation (1 min, 5000 rpm, RT). Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule zum Waschen der DNA mit 0.75 mL PE-Puffer versetzt, 5 min bei RT inkubiert und 1 min bei 5000 rpm zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Durchflusses wurde ein weiteres Mal 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert und zur Entfernung des Ethanol 5 min bei 37 °C im Heizblock erwärmt. Die DNA wurde schließlich zweimal mit je 25 µL EB-Puffer nach 5-minütiger Inkubation und anschließender Zentrifugation (1 min, 13000 rpm, RT) von der Säule eluiert.

2.2.8 Ligation von DNA-Fragmenten

Die zur Ligation verwendete T4-DNA-Ligase bewirkt die Bildung einer Phosphodiesterbindung durch Katalyse des nukleophilen Angriffs der 3'-OH-Gruppe auf die 5'-Phosphatgruppe doppelsträngiger DNA unter ATP-Verbrauch.

Ein typischer Reaktionsansatz mit einem Volumen von 20 µL enthielt etwa 20 fmol Vektor-DNA, 100 fmol Insert-DNA, 2 µL 10 x Ligase-Puffer, 400 U DNA-Ligase sowie die entsprechende Menge H_2O . Der Ansatz wurde 12 h bei 16 °C inkubiert.

2.2.9 Entsalzung des Ligationsansatzes

Da die im Ligasepuffer enthaltenen Salze die nachfolgende Transformation durch Elektroporation stören würden, musste der Ligationsansatz vorher entsalzt werden.

Die Entsalzung erfolgte durch Dialyse mit Dialysefiltern von *Millipore* mit einer Porengröße von 0.025 µm für 30 min gegen das 2000fache Volumen H_2O .

2.2.10 Transformation

Für Retransformationen wurde meist die Methode der Hitzeschocktransformation unter Verwendung chemisch kompetenter Zellen – hergestellt nach der Rubidiumchlorid-Methode – angewendet [103, 106]. Bei Klonierungen wurde eine Elektroporation durchgeführt [103, 107, 108], da bei dieser Methode die Kompetenz der Zellen etwa um den Faktor 10^3 besser ist. Hierbei werden die elektrokompetenten Zellen kurzzeitig einem starken elektrischen Feld ausgesetzt. Dieses erhöht kurzzeitig die Permeabilität der Bakterienmembran und sorgt dadurch für eine Aufnahme der DNA in die Zelle.

2.2.10.1 Chemische Transformation

Bei der chemischen Transformation wurden 50 µL hitzekompetente *E. coli*-Zellen auf Eis mit 0.2 µL Plasmid-DNA versetzt und 30 min bei 0 °C inkubiert. Die Aufnahme der Plasmid-DNA erfolgte während eines 90-sekündigen Hitzeschocks bei 42 °C. Anschließend wurden die Zellen 2 min auf Eis inkubiert, bevor 1 mL LB-Medium zugegeben wurde und die Zellen zur Ausbildung der Antibiotikaresistenz 1 h bei 37 °C und 225 rpm inkubiert wurden. Anschließend wurden 5 % der Zellen auf antibiotikahaltigen Agarplatten ausplattiert und die Agarplatten über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.2.10.2 Elektroporation

Für die Transformation elektrokompeter Zellen wurde das Elektroporationsgerät Micro PulserTM der Firma *Biorad* benutzt. Zwischen 0.2 µL (Retransformation) und 1 µL (Ligationsansatz) Plasmid-DNA wurden mit 50 µL elektrokompenten *E. coli*-Zellen in eine vorgekühlte 200 µL Elektroporationsküvette (*Molecular Bio Products*) mit einer Spaltbreite von 2 mm gegeben. Die Zellen wurden dann für 5-6 ms einem elektrischen Puls ausgesetzt (Programm Eco2; entspricht einem Puls bei einer Spannung von 2.5 kV). Nach der Entladung wurden die Zellen unverzüglich in 1 mL LB-Medium aufgenommen und 1 h bei 37 °C, 225 rpm zur Ausbildung der Antibiotikaresistenz inkubiert, bevor sie auf antibiotikahaltigen Agarplatten ausplattiert wurden. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37 °C.

2.2.11 Ortsspezifische Mutagenese

Für die ortsspezifische Mutagenese zum Austausch einzelner Aminosäuren im Genprodukt wurde das QuikChange[®] Site-Directed Mutagenesis Kit (*Stratagene*) verwendet.

Durch die Benutzung Mutationen-enthaltender Primer wurde zunächst in einer PCR-Reaktion die gewünschte Base in das Templat eingeführt. Hierfür wurde die Pfu-Turbo-DNA Polymerase verwendet, die sich durch besonders hohe Genauigkeit bei der Anlagerung der Primer und durch hohe *proofreading*-Aktivität auszeichnet. Als DNA-Templat wurde über Säulchen aufgereinigte Plasmid-DNA verwendet. Die Oligonukleotidprimer wurden jeweils so entwickelt, dass sie komplementär sowohl zu den beiden DNA-Strängen als auch zueinander waren und die gewünschte Mutation etwa in der Mitte enthielten. Zusätzlich zu den gewünschten Mutationen wurde (sofern möglich) eine stille Mutation eingeführt, die die Erfolgskontrolle der Reaktion durch einen analytischen Restriktionsverdau ermöglichte. Um die korrekte Anlagerung der Primer an die Templat-DNA zu gewährleisten, besaßen die Primer eine Schmelztemperatur von 78-81°C, die sich berechnet nach:

$$T_M = 81.5 + 0.41(\%GC) - \frac{675}{N - \%mismatch}$$

(N=Primerlänge, %GC und % mismatch in ganzen Zahlen)

Ein typischer Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

5 μ L 10 x Reaktionspuffer
 10 ng Plasmid-DNA
 125 ng Primer 1
 125 ng Primer 2
 1 μ L dNTP mix (2mM)
 bd H₂O ad 50 μ L
 2.5 U μ L PfuTurbo DNA Polymerase

Das Temperaturprogramm zur Einführung von Punktmutationen zum Austausch einzelner Aminosäuren wurde in einem Gene Amp PCR System 2400 (*Perkin Elmer*) durchgeführt. Es wurde folgendes Temperaturprogramm verwendet:

95 °C	30 s	
<hr/>		
95 °C	30 s	
55 °C	1 min	16 Zyklen
68 °C	1 min/kbp Plasmid	
<hr/>		
4 °C	∞	

Zur Kontrolle der Reaktion wurde eine analytische Agarosegelelektrophorese durchgeführt.

Um die noch im Ansatz vorhandene methylierte Templat-DNA abzubauen, wurde der komplette Reaktionsansatz mit 1 μ L der Restriktionsendonuclease DpnI [109] (10 U/ μ L, *Stratagene, NEB*) versetzt und 1 h bei 37 °C inkubiert.

Die nun erhaltene mutierte doppelsträngige, jedoch unterbrochene, Plasmid-DNA wurde schließlich in kompetente Zellen transformiert. Hierbei wurde entweder chemisch in superkompetente *E. coli* XL1-Blue Zellen transformiert, indem die mit 1 μ L DNA versetzte Zellsuspension einem 45-sekündigen Hitzeschock bei 42 °C ausgesetzt wurde, oder alternativ 1 μ L der DNA in elektrokompente DH5 α -Zellen durch Elektroporation transformiert. In beiden Fällen wurde die Zellsuspension direkt nach der Transformation in vorgewärmtem NZY⁺ Medium aufgenommen, 1 h bei 37 °C und 225 rpm inkubiert und auf antibiotikumhaltige LB-Agar-Platten ausgestrichen.

2.2.12 Plasmidpräparation

Die verwendete Methode zur Plasmid-Präparation entspricht einer modifizierten Methode nach Birnboim und Doly [110]. Das Prinzip beruht darauf, dass chromosomale DNA unter alkalischen Bedingungen denaturiert vorliegt, während die Plasmid-DNA aufgrund der superhelikalen Form relativ stabil ist. RNA, chromosomale DNA, Proteine und Zelltrümmer werden nach Neutralisation ausgefällt, während die Plasmid-DNA im Überstand verbleibt. Je nach gewünschtem Reinheitsgrad kann die Plasmid-DNA mit Alkohol gefällt oder mittels Chromatographie isoliert werden.

2.2.12.1 Mini-Plasmidpräparation unter Verwendung von Silicagel-Säulchen

Zur Präparation von Plasmiden für weitere Klonierung oder Sequenzierung wurde das Protokoll des QIAprep Miniprep Kits angewendet. Hier wird die DNA nach Lyse der Bakterienzellen unter Hochsalzbedingung an eine Silicamembran gebunden, während Kontaminationen die Säule passieren [105].

Die Zellen einer 3 mL-Übernachtskultur wurden durch Zentrifugation in einer Tischzentrifuge pelletiert (2 min, 5000 rpm, RT) und das Pellet in 250 µL P1-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 250 µL P2-Puffer und vorsichtigem Invertieren wurde die Zellsuspension 5 min bei RT inkubiert. Die Suspension wurde dann mit 350 µL N3-Puffer versetzt, vorsichtig durchmischt und 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde zur Abtrennung der ausgefällten Proteine und der chromosomalen DNA für 15 min bei 13000 rpm zentrifugiert und der Überstand auf eine QIAprep spin Säule (*QIAGEN*) aufgetragen. Die Säule wurde 5 min bei RT inkubiert, 60 s bei 5000 rpm zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Die an die Säulenmatrix gebundene DNA wurde mit 750 µL PE-Waschpuffer durch 5-minütige Inkubation und 30-sekündige Zentrifugation bei 5000 rpm gewaschen. Erneute Zentrifugation für 1 min bei 13000 rpm und Trocknung der Membran für 5 min bei 37 °C entfernten den restlichen Waschpuffer. Schließlich wurde die Plasmid-DNA mit 50 µL auf 50 °C vorgewärmtem EB-Puffer nach 5-minütiger Inkubation bei RT durch Zentrifugation (1 min, 13000 rpm, RT) eluiert.

2.2.12.2 Mini-Plasmidpräparation mit anschließender Alkoholpräzipitation (*quick-and-dirty*)

3 mL einer Übernachtskultur wurden durch 2-minütige Zentrifugation bei 5000 rpm in einer Tischzentrifuge pelletiert und das Pellet in 250 µL P1-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von

250 μ L P2-Puffer und 5-minütiger Inkubation bei RT wurden 350 μ L P3-Puffer zum Präparationsansatz hinzugegeben und dieser 15 min auf Eis inkubiert. Durch Zentrifugation (15 min, 13000 rpm, RT) wurden Proteine und chromosomale DNA pelletiert. Die im Überstand vorhandene Plasmid-DNA wurde mit 600 μ L Isopropanol nach 30-minütiger Inkubation auf Eis durch Zentrifugation (13000 rpm, 30 min, 4 °C) gefällt. Der Niederschlag wurde mit 300 μ L 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (10 min, 13000 rpm, 4 °C). Nach Abnahme der Waschlösung wurde zur Entfernung des Ethanols noch einmal zentrifugiert und das Pellet 5 min bei 37 °C im Heizblock getrocknet. Das Plasmid-DNA Pellet wurde in 50 μ L EB-Puffer aufgenommen.

2.2.12.3 Midi-Plasmidpräparation

Zur Präparation größerer DNA-Mengen wurde das *QIAGEN* Plasmid Midi Kit verwendet, das auf einer modifizierten alkalischen Lyse gefolgt von einer Anionenaustauscherchromatographie unter geeigneten pH- und Niedrigsalzbedingungen und einer Alkoholpräzipitation beruht.

Eine 3 mL-Starterkultur wurde mit einer einzelnen Kolonie einer Agarplatte angeimpft und 8 h bei 37 °C und 250 rpm angezogen. Mit dieser Starterkultur wurden dann eine 100 mL-Kultur 1/500 angeimpft und diese über Nacht bei 37 °C und 250 rpm inkubiert. Nach Ernten der Bakterien (15 min, 4000 rpm, 4 °C) wurde das Zellpellet in 4 mL Puffer P1-Puffer resuspendiert. Es wurden dann 4 mL P2-Puffer hinzugegeben und nach vorsichtigem Mischen 5 min bei RT inkubiert. Nach Hinzugeben von 4 mL eisgekühltem P3-Puffer wurde die Suspension 15 min auf Eis inkubiert und Proteine, chromosomale DNA und Zelltrümmer durch Zentrifugation in 2 mL-Reaktionsgefäßen (13000 rpm, 30 min, 4 °C) abgetrennt. Der Überstand wurde sofort abgenommen, ein weiteres Mal für 15 min zentrifugiert und dann auf eine mit 4 mL QBT-Puffer equilibrierte *QIAGEN*-tip 100 Säule gegeben. Die Säule wurde zweimal mit je 10 mL QC-Puffer gewaschen und die DNA mit 5 mL QF-Puffer eluiert. Zur Ankonzentrierung der Plasmid-DNA wurde das Eluat mit 3.5 mL Isopropanol versetzt und nach sorgfältigem Mischen in 2 mL-Reaktionsgefäße überführt und zentrifugiert (13000 rpm, 30 min, 4 °C). Die Überstände wurden entfernt und die Pellets mit insgesamt 2 mL 70 % (v/v) Ethanol gewaschen. Nach Abnahme der Waschlösung wurde zur Entfernung des Ethanols noch einmal zentrifugiert und das Pellet 5 min bei 37 °C im Heizblock getrocknet. Anschließend wurde das Pellet in 50 μ L EB-Puffer aufgenommen.

2.2.13 Präparation genomischer DNA

Die Präparation genomischer DNA aus *Pseudomonas aeruginosa* erfolgte durch Phenol/Chloroform-Extraktion gefolgt von einer Alkoholfällung der Nukleinsäuren. Wurde die genomische DNA als Templat für eine PCR-Reaktion verwendet, wurde anschließend die noch vorhandene RNA mit RNase A verdaut.

Ausgehend von einer Agar-Stab-Kultur wurden Zellen des Stammes PAO1 mit einer Impföse auf LB-Agar ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. 3 mL LB-Medium wurden mit einer Einzelkolonie angeimpft und die Zellen über Nacht bei 37 °C und 225 rpm angezogen.

Die Übernachtskultur wurde in einem Reaktionsgefäß 3 min bei 13000 rpm pelletiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 700 µL TE-Puffer resuspendiert. 700 µL einer 1:1 Phenol/Chloroform-Mischung wurden zu dem Pellet gegeben und lange vorsichtig invertiert. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 13000 rpm wurde die wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Phenol/Chloroform-Extraktion weitere zwei Mal wie zuvor beschrieben durchgeführt. Dann wurde die wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 1 Volumen Chloroform versetzt, invertiert und zentrifugiert (13000 rpm, 10 min). Auch diese Extraktion wurde weitere zwei Mal wiederholt.

Die wässrige Phase wurde mit einem Zehntel des Volumens 3 M NaOAc, pH 5.0 versetzt und sorgfältig gemischt. Zur Fällung der DNA wurde schließlich das gleiche Volumen Isopropanol hinzugegeben und sorgfältig invertiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (30 min, 13000 rpm, 4 °C) wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit 400 µL 80 % EtOH gewaschen.

Nach 30-minütiger Trocknung bei RT wurde das Pellet in 50 µL TE-Puffer mit 10 µg/µL RNase A aufgenommen und die DNA mit Chloroform extrahiert. Abschließend wurde die DNA wiederum mit Isopropanol gefällt, mit EtOH gewaschen, getrocknet und in 50 µL TE-Puffer gelöst.

TE-Puffer
10 mM Tris/HCl, pH 7.5
1 mM EDTA

2.2.14 Verdau der genomischen DNA

Ein typischer Verdau genomischer DNA für den Southern-Blot setzte sich folgendermaßen zusammen:

30 µL genomische DNA
30 Units Enzym
6 µL 10 x Puffer
ad 60 µL mit bd H₂O

Die Lösung wurde über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.2.15 NaAc/EtOH-Fällung des Verdaus mit anschließender Elektrophorese

Der Verdau wurde mit 0.1 Volumen 3 M NaOAc, pH 5.0 und 2.5 Volumen EtOH versetzt, vortexiert und 30 min bei –20°C inkubiert. Nach 30-minütiger Zentrifugation (13000 rpm, 4 °C) wurde das Pellet mit 500 µl 70 % EtOH gewaschen und dann 1 h bei RT getrocknet. Schließlich wurde das Pellet durch Auf- und Abpipettieren in 15 µL bd H₂O gelöst, mit 3 µL 6 x loading buffer (*Fermentas*) versetzt und auf ein 1 %iges Agarosegel aufgetragen. Als Marker wurden 10 µL des DNA molecular weight markers VII (*Roche*) versetzt mit 2 µl loading buffer verwendet. Die Elektrophorese wurde bei 100 V in einer Agagel Mini Elektrophoreseapparatur (*Biometra*) durchgeführt.

2.2.16 Southern-Blot

Bei einem Southern-Blot werden DNA-Fragmente, die zuvor mittels Gelelektrophorese ihrer Länge nach aufgetrennt wurden, auf einer Membran fixiert, um anschließend durch Hybridisierung mit einer markierten Sonde einzelne DNA-Fragmente spezifisch nachweisen zu können [111].

Als Vorbereitung für den eigentlichen Blotvorgang wurde das Agarosegel zunächst für 15 min in 200 mL Depurinierungslösung geschwenkt, um durch partielle Depurinierung kleinere DNA-Fragmente zu erhalten. Zum Aufschmelzen des DNA-Doppelstranges wurde das Gel dann für 30 min in 200 mL Denaturierungslösung und schließlich für weitere 30 min in 200 mL Neutralisierungslösung geschwenkt.

Depurinierungslösung

0.25 M HCl

Denaturierungslösung

0.5 M NaOH

1.5 M NaCl

Neutralisierungslösung

1 M Tris

1.5 M NaCl

Die DNA wurde durch Vakuumblotting auf eine Nylonmembran (*Roche*) übertragen. Hierbei wurde die Blot-Apparatur (*Biometra*) zunächst mit 3 MM Filterpapier (*Whatman*) belegt und mit 20 x SSC-Puffer getränkt. Nach dem Auflegen eines schwarzen Abdeckgummis wurde die 12x14 cm große, positiv geladene Nylonmembran, die zuvor in 2 x SSC-Puffer geschwenkt wurde, hinzugefügt und mit 20 x SSC-Puffer überschichtet. Als letztes folgte das Auflegen des Agarosegels, das wiederum mit 20 x SSC-Puffer getränkt wurde. Nach dem Schließen der Blotapparatur wurde ein Vakuum von 50 mbar für mehrere Stunden angelegt und das Gel alle 30 min mit 20 x SSC überschichtet, um ein Austrocknen zu verhindern.

20 x SSC-Puffer

3 M NaCl

300 mM Na₃Citrat

Mit HCl auf pH 7.0 einstellen

Zur vollständigen und kovalenten Bindung der DNA an die Membran wurde diese nach dem Abtrocknen mit 3 MM Whatman Filterpapier mit UV-Licht bestrahlt. Dieser Vorgang, den man auch als *cross-linking* bezeichnet, wurde an einem Stratalinker® UV-Crosslinker Model 2400 (*Stratagene*) bei 120 mJ/cm³ und einer Wellenlänge von 254 nm durchgeführt.

Für die Prähybridisierung wurde die Membran nun mit der Membranseite nach innen in ein Hybridisierungsröhrchen überführt und 1 h in 19 mL auf 68 °C vorgewärmter Prähybridisierungslösung und 1 mL Blocking Reagenz (*Roche*) bei 68 °C gedreht. Zuvor

wurde das leere Hybridisierungsröhrchen mit ca. 7 mL 1 M NaOH befüllt und im Hybridisierungsofen 10 min 68 °C rotiert. Schließlich wurde die NaOH entfernt und das Röhrchen auf die gleiche Weise wie soeben beschrieben dreimal mit Wasser gewaschen.

Prähybridisierungslösung

250 mM Na₂HPO₄

1 mM Na₂EDTA·7H₂O

Auf pH 2.0 mit Phosphorsäure einstellen

mit bd H₂O auf ein Volumen von 300 mL auffüllen,
autoklavieren

20 % SDS (w/v) hinzugeben

mit bd H₂O auf 400 mL auffüllen

Blocking Lösung

2 g Block Reagenz (*Roche*)

mit Maleinsäure pH 7.5 auf 20 mL auffüllen

Die Hybridisierung erfolgte bei 68 °C über Nacht durch Drehen in 20 mL Hybridisierungslösung.

Hybridisierungslösung

Prähybridisierungslösung

5 µL Gentamycinsonde [112]

Die Membran wurde nun dreimal 20 min bei 68 °C mit 20 mL Waschlösung gewaschen und dann bei RT 5 min in Maleinsäurepuffer und 1 h in 20 mL Blocking-Lösung inkubiert. Schließlich wurde die Membran 30 min in 20 mL Blocking-Lösung mit 1.5 µL des Antikörpers Anti-Dioxigenin-AP-Fragment (*Roche*) inkubiert und viermal 10 min mit Maleinsäurepuffer und 5 min mit Substratpuffer gewaschen.

Waschlösung

20 mM Na₂PO₄

Mit Phosphorsäure auf pH 7.2 einstellen

1 mM EDTA

1 % (w/v) SDS

Mit bd H₂O auf 1 L auffüllen, autoklavieren

Maleinsäurepuffer

100 mM Maleinsäure

3 M NaCl

Mit NaOH auf pH 8.0 einstellen, autoklavieren

+ 0.3 % (v/v) Tween

Substratpuffer

100 mM Tris/HCl, pH 9.5

100 mM NaCl

Die Membran wurde nun aus dem Hybridisierungsröhrchen entnommen und mit der DNA-Seite nach oben auf einer Folie mit 1.5 mL Substratpuffer mit 15 µL CPD-Star (*Roche*) überschichtet. Die markierten Banden wurden schließlich nach 60 min durch Messen der Chemilumineszenz mittels eines Dokumentationssystems (Molecular image[®] Fx, *Biorad*) visualisiert.

2.2.17 DNA-Konzentrationsbestimmung

2.2.17.1 Photometrische DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration von DNA-Lösungen wurde mit einem Zweistrahlsspektralphotometer U 2000 von *Hitachi* durch Messung der Extinktion bei $\lambda=260$ nm bestimmt. Gemessen wurden meist 1:100 Verdünnungen. Die Konzentration ergab sich nach:

$$c_{DNA} [ng/\mu L] = E_{260} \cdot 100 \cdot 50 ng/\mu L$$

Durch Messung bei der Extinktion bei $\lambda=280$ nm konnte der Proteinanteil bestimmt werden. Hierbei ergab sich der Reinheitsgrad der DNA-Probe durch Bildung des Quotienten E_{260}/E_{280} .

2.2.17.2 DNA-Konzentrationsbestimmung anhand von Agarosegelen

Da die bei Agarosegelen als Marker verwendete *peqGOLD Range Mix* DNA-Leiter von *peQLab* aus Banden definierter DNA-Mengen besteht, ließ sich durch Vergleich der Stärke der Banden ähnlicher Größe die Menge an aufgetragener DNA abschätzen.

2.2.18 Sequenzierung

Um die Sequenz der klonierten Genkonstrukte zu kontrollieren, wurde die Didesoxymethode nach Sanger [113] verwendet. Hierbei wurden DNA-Fragmente, die am 3'-Ende basenspezifische Fluoreszenzmarkierungen trugen, der Größe nach aufgetrennt und anhand der Markierung identifiziert.

Hierzu wurde ein ABI Prism 310 Genetic Analyzer der Firma *ABI* verwendet.

Die benötigten DNA-Fragmente wurden durch Umsetzung von 500 nmol zu sequenzierender DNA mit 10 pmol eines geeigneten Sequenzierungsprimers und 3 µL des ABI Prism dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kits erhalten. Als Sequenzierungsprimer für Konstrukte im pET-Vektor wurden der pET.up- und der pET.T7-Term-Primer verwendet.

Es wurde folgendes Temperaturprogramm verwendet:

96 °C	10 s	25 Zyklen
50 °C	5 s	
60 °C	4 min	
4 °C	∞	

Zur Aufarbeitung des Ansatzes wurden zur Reaktionslösung 80 µL *bd* H₂O, 10 µL NaOAc (3 M, pH 4.8) sowie 250 µL Ethanol gegeben, kurz vortexiert und 30 min bei 4 °C und 13000 rpm in einer Kühlzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt, das Pellet mit eiskaltem 80 % (v/v) Ethanol gewaschen und 1 h bei 37 °C getrocknet. Der Ansatz wurde in 40 µL H₂O (*HPLC-grade*) aufgenommen, 5 min bei 95 °C denaturiert und zur Analyse in geeignete Proben tubes überführt.

Alternativ wurden Sequenzierungen von der Firma *GATC* (<http://www.gatc.de>) durchgeführt.

2.2.19 Stammhaltung

Zur Lagerung von Bakterienstämmen wurden Glycerinkulturen angelegt. Hierzu wurden 500 µL einer Übernachtskultur mit 1 mL Glycerin sorgfältig vortexiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –80 °C gelagert.

2.3 Mikrobiologische Methoden

Die im folgenden beschriebenen Arbeiten mit dem Organismus *P. aeruginosa* PAO1 wurden in der Arbeitsgruppe von Max Schobert (TU Braunschweig) gemäß Gentechnikgesetz (GenTG) vom 20.06.1990 durchgeführt und fielen unter die Sicherheitsstufe S2.

2.3.1 Phänotypencharakterisierung

2.3.1.1 Wachstumskurven unter aeroben Bedingungen

50 mL LB*- bzw. AB-Medium in einem 300 bzw. 500 mL Schikanekolben wurden mit einer 4 mL LB*/AB-Übernachtskultur so angeimpft, dass die OD₅₇₈ 0.05 betrug. Die Kolben wurden bei 37 °C und 200 rpm in einem Wasserschüttler inkubiert. Während der logarithmischen Wachstumsphase wurden alle 30 min, später alle 60 min Proben entnommen und die OD bei 578 nm gemessen. Die Entnahme der letzten Probe erfolgte nach 24 h.

2.3.1.2 Wachstumskurven unter anaeroben Bedingungen

140 mL LB*/AB-Nitrat in einem 150 mL Anaerobenfläschchen mit Silikongummideckel wurden mit einer 4 mL LB*/AB-Übernachtskultur so angeimpft, dass die OD₅₇₈ 0.05 betrug. Die Fläschchen wurden bei 37 °C und 100 rpm in einem Wasserschüttler inkubiert. Die Probenentnahme zur Messung der Optischen Dichte bei 578 nm erfolgte mit einer Kanüle alle 60 min. Die letzte Probe wurde nach 24 h entnommen.

2.3.1.3 Wachstumskurven unter NO-Stress

50 mL LB*-Medium bzw. 10 mM SNP (SNP=sodium nitroprusside, Na₂[Fe(CN)₅(NO)])-LB*-Medium in einem 500 mL Schikanekolben wurden mit einer 4 mL LB*-Übernachtskultur so angeimpft, dass die OD₅₇₈ 0.05 betrug. Die Kolben wurden bei 37 °C und 200 rpm in

einem Wasserschüttler inkubiert. Während der exponentiellen Wachstumsphase wurden alle 30 min, später alle 60 min unter sterilen Bedingungen Proben entnommen und die OD₅₇₈ gemessen.

2.3.1.4 Wachstumskurven und Bestimmung der Lebendzellzahl nach Inkubation in Tryptophan- bzw. Riboflavin-haltigem Medium

Eine 4 mL AB-Kultur wurde mit einer Einzelkolonie – gewachsen auf einer AB-Platte – angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. 50 mL 30 mM Tryptophan-haltiges bzw. 0.1 mM Riboflavin-haltiges AB-Medium in einem 300 mL Schikanekolben wurden mit dieser Übernachtskultur so angeimpft, dass die OD₅₇₈ 0.05 entsprach. Während der logarithmischen Wachstumsphase wurden alle 30 min, später alle 60 min unter sterilen Bedingungen Proben zur Bestimmung der OD₅₇₈ entnommen.

Nach 24 und 36 h wurde unter sterilen Bedingungen eine Probe entnommen und 100 µL der 10⁻⁷ und 50 µL der 10⁻⁶-Verdünnung auf LB*-Agar ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert und die Lebendzellzahl durch Auszählen der Kolonien bestimmt.

2.3.1.5 Überleben in anaerober Stationärphase

140 mL LB*-Nitrat in einem 150 mL Anaerobenfläschchen mit Silikongummideckel wurden mit einer 4 mL-LB*-Übernachtskultur so angeimpft, dass die Optische Dichte bei 578 nm 0.05 entsprach. Die Fläschchen wurden bei 37 °C und 100 rpm inkubiert und nach 20 h, 26 h, 44 h und 50 h wurden unter sterilen Bedingungen mit einer Kanüle Proben entnommen. Die Zellen zweier benachbarter Verdünnungen wurden wie unten angegeben auf LB*-Agar ausplattiert. Nach Inkubation der Platten über Nacht bei 37 °C wurde am nächsten Morgen die Lebendzellzahl durch Auszählen der gewachsenen Kolonien bestimmt.

20 h: 100 und 50 µL der 10⁻⁴ und 10⁻⁵-Verdünnung

26 h: 50 µL der 10⁻³ und 10⁻⁴-Verdünnung

44 h: 50 µL der 10⁻² und 10⁻³-Verdünnung

50 h: 50 µL der 10⁻² und 10⁻³-Verdünnung

2.3.1.6 Bestimmung der Lebendzellzahl nach Peroxid-Stress

Eine 20 mL-LB*-Kultur wurde mit einer 4 mL LB*-Übernachtskultur so angeimpft, dass die optische Dichte bei 578 nm 0.05 entsprach und aerob über Nacht bei 37 °C und 200 rpm

inkubiert. 1 mL einer 10^{-3} Verdünnung wurde mit 2 μL 30 % H_2O_2 (v/v) versetzt und bei 37 °C und 700 rpm im Eppendorf-Schüttler inkubiert. Nach 20 sowie 40 Minuten wurden ebenfalls 50 μL Zellen entnommen, die nachfolgend angegebenen Verdünnungen und Mengen auf LB*-Agar ausplattiert und die Platten über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die Lebendzellzahl durch Auszählen der Kolonien bestimmt.

0-Wert: 100 μL der 10^{-7} -Verdünnung

20-Minuten-Wert: 50 μL der 10^{-4} und 100 μL der 10^{-5} -Verdünnung

40-Minuten-Wert: 50 μL des 10^{-3} und 100 μL der 10^{-4} -Verdünnung

2.3.1.7 Bestimmung der Lebendzellzahl nach UV-Stress

Eine 20 mL-LB*-Kultur wurde mit einer 4 mL LB*-Übernachtskultur so angeimpft, dass die optische Dichte bei 578 nm 0.05 entsprach und aerob über Nacht bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Unter sterilen Bedingungen wurde eine Probe entnommen und 100 μL einer 10^{-6} -, 10^{-5} - und 10^{-4} -Verdünnung auf LB*-Agar ausplattiert. Die Platten wurden dann in einem Stratalinker® UV-Crosslinker Model 2400 (*Stratagene*) UV-Licht der Wellenlänge von 254 nm und einer Energie von 1, 2 bzw. 4 mJ ausgesetzt. Zur Negativkontrolle wurden 100 μL der 10^{-7} -Verdünnung einer nicht bestrahlten Probe auf LB*-Agar ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert und die Lebendzellzahl durch Auszählen der gewachsenen Kolonien bestimmt.

2.3.1.8 Bestimmung der Lebendzellzahl nach Hitzeschock

Eine 20 mL-LB*-Kultur wurde mit einer 4 mL LB*-Übernachtskultur so angeimpft, dass die optische Dichte bei 578 nm 0.05 entsprach und aerob über Nacht bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. 50 μL dieser Kultur wurden als t_0 -Probe entnommen und eine Verdünnungsreihe 10^{-1} - 10^{-7} in LB*-Medium angesetzt. Die 10^{-2} -Verdünnung wurde bei 53 °C und 700 rpm im Eppendorf-Schüttler inkubiert und nach 60 Minuten eine Probe entnommen. Ausplattiert auf LB*-Agar wurden 50 μL einer 10^{-6} -Verdünnung der t_0 - Probe sowie jeweils 100 μL der 10^{-5} - und 10^{-4} -Verdünnung der 60-Minuten-Probe. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert und die Lebendzellzahl durch Auszählen der Kolonien bestimmt.

2.3.1.9 Bestimmung des Hemmhofradius‘ nach Peroxid- oder Paraquat-Stress

Eine 4 mL LB*-Kultur wurde mit einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 37 °C aerob inkubiert. Eine 20 mL-LB*-Kultur wurde mit der 4 mL LB*-Übernachtskultur so angeimpft, dass die optische Dichte bei 578 nm 0.05 entsprach und aerob über Nacht bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Eine Probe dieser Kultur wurde entnommen und 100 µL einer 10⁻²-Verdünnung auf LB*-Agar ausplattiert. Ein steriles Whatman-Filterpapier mit einem Durchmesser von 6 mm wurde in die Mitte der Platte gelegt und mit 10 µL H₂O₂- bzw. Paraquat-Lösung (1,1'-Dimethyl-4,4'-bipyridinium dichloride hydrate, *Fluka*) der angegebenen Konzentration beträufelt. Nach Inkubation der Platten bei 37 °C über Nacht wurde der Hemmhof mit einem Lineal ausgemessen.

2.3.2 Pathogenizitätstest

Um zu untersuchen, ob durch den Dodecin-Knockout die Pathogenizität herabgesetzt wird, wurde ein Pathogenizitätstest wie unter [114] beschrieben, durchgeführt.

Hierzu wurden Romana Salatblätter mit 0.1 % H₂O₂ gewaschen und auf sterilem Filterpapier, das mit 10 mM MgSO₄ angefeuchtet wurde, ausgebreitet. Mit einem sterilen Skalpell wurden die Strünke der Salatblätter so angeritzt, dass ein etwa 1 cm langer Schnitt entstand.

P. aeruginosa Zellen, die in LB*-Medium bei 37 °C bis zur Sättigung heranwuchsen, wurden pelletiert, das Pellet mit 10 mM MgSO₄-Lösung gewaschen und in entsprechender Menge 10 mM MgSO₄-Lösung resuspendiert, sodass eine OD₅₇₈ von 0.2 erreicht wurde. Jeweils 10 µL einer 10⁻² bzw. 10⁻³-Verdünnung in 10 mM MgSO₄ wurden in den Schnitt der Salatstrünke pipettiert und die Salatblätter für 5 Tage in einer geschlossenen Schale bei 30 °C inkubiert.

2.4 Proteinchemische Methoden

2.4.1 Produktion von rekombinantem Protein

Zur rekombinanten Produktion von Proteinen wurden *E. coli*-Zellen vom Stamm BL21-Gold(DE3) verwendet; die Expression wurde in Antibiotika-haltigem LB- oder TB-Medium durchgeführt. Die Induktion der Expression wurde entweder mittels Zugabe von IPTG oder durch Autoinduktion [115] hervorgerufen.

2.4.1.1 Testexpression

Durch Testexpressionen wurde das Wachsen der Bakterien unter verschiedenen Bedingungen getestet. Hierzu wurden im Allgemeinen 50 mL Antibiotikum-haltiges Medium mit einer 3 mL-Übernachtskultur von BL21-Gold(DE3)-Zellen 1:50 angeimpft und diese bei unterschiedlichen Bedingungen inkubiert.

a) Induktion mit IPTG

Nach Erreichen einer OD₅₉₅ von 0.5-0.6 wurde die Kultur durch Zugabe von IPTG induziert und 4-6 h bei 37 °C und 225 rpm inkubiert.

b) Autoinduktion

Die Kultur wurde nach Erreichen der stationären Phase noch weitere 12-18 h bei 37 °C und 225 rpm inkubiert, bis die Bakterienzellen eine OD₅₉₅ von 4.5-6.0 erreicht hatten.

Nach Beendigung der Proteinexpression wurden die Bakterien durch Zentrifugation (4000 rpm, 15 min, 4 °C) geerntet und die Pellets in 1 mL AM-Puffer resuspendiert. Die Suspension wurde in flüssigen Stickstoff getropft und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.4.1.2 Expression in präparativem Maßstab

Ausgehend von einer 50 mL Übernachtskultur wurden 2 L Antibiotikum-haltiges Medium in einem 5 L-Erlenmeyerkolben 1:50 angeimpft und 18-24 h bis zu einer OD₅₉₅ von 4.5-6.0 inkubiert. Alternativ wurden 2 L Antibiotikum-haltiges Medium in einem 5 L-Erlenmeyerkolben, das 1:50 mit der Übernachtskultur angeimpft wurde, bei einer OD₅₉₅ von 0.5 mit 1 mM IPTG induziert und nach Induktion noch weitere 4-5 h inkubiert. Die Zellen wurden dann durch Zentrifugation für 15 min bei 8000 rpm und 4 °C in einer Kühlzentrifuge mit JA-10-Rotor geerntet. Der Überstand wurde verworfen und die Pellets in insgesamt 20 mL AM-Puffer resuspendiert. Die Suspension wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.4.2 Zellaufschluss

2.4.2.1 Testaufschluss

Zum analytischen Zellaufschluss wurde das Ultraschallgerät Nonoplus HD 200 der Firma *Bandelin* verwendet. 0.5 g Zellsuspension wurden im 1.5 mL-Reaktionsgefäß mit 5 µL 100 mM EDTA, 0.5 µL 0.2 M PMSF und 1 µL 50 mM Lysozym versetzt und 10 min bei RT

inkubiert. Dann erfolgte der Aufschluss durch dreimal 15 Ultraschall-Impulse (Programm 40,72 D) unter Eiskühlung. Anschließend wurden unlösliche Bestandteile durch Zentrifugation (13000 rpm, 30 min, 4 °C) entfernt.

2.4.2.2 Präparativer Aufschluss

Zum präparativen Aufschluss der Zellen wurde entweder eine French Press der Firma *Sim Aminco* oder ein Homogenisator der Firma *Avestin* verwendet. In beiden Fällen werden die Zellen zunächst einem hohen Druck ausgesetzt, der beim Austritt der Lösung durch eine kleine Öffnung schlagartig nachlässt. Dabei treten Scherkräfte auf, die zum Zerreißen der Zellwände und zum Freisetzen des Zellinhalts führen.

Die Zellsuspension wurde kurz vor dem Aufschluss mit 1/1000 des Volumens 0.2 M PMSF versetzt und der Aufschluss mehrmals unter Eiskühlung durchgeführt. Anschließend wurden die aufgeschlossenen Suspensionen durch Zentrifugation (18000 rpm, 30 min, 4 °C, JA20) von unlöslichen Bestandteilen befreit.

2.4.3 Hitzedenaturierung

Durch eine Hitzefällung konnten temperaturempfindliche *E. coli*-Proteine aus dem Zelllysat nach dem Aufschluss entfernt werden. Dadurch konnte bei der Aufreinigung temperaturstabiler Proteine bereits ein erster Reinigungseffekt erzielt werden.

Dazu wurde das Zelllysat in einem Wasserbad oder einem Heizschüttler (*Eppendorf*) 10 min bei 65-75 °C erwärmt. Um einen guten Wärmeaustausch zu gewährleisten, wurden auch größere Probenvolumina in 2 mL Reaktionsgefäßen erhitzt. Die Abtrennung ausgefallener Proteine erfolgte durch Zentrifugation (13000 rpm, 30 min, 4 °C).

2.4.4 Chromatographische Methoden

Für die Proteinchromatographie wurde ein FPLC-System oder ein ÄKTA® Purifier (beides *GE-Healthcare*) verwendet. Vor Benutzung wurden die verwendeten Säulen mit drei Säulenvolumina $\text{bd H}_2\text{O}$ gewaschen und mit 3 Säulenvolumina Puffer equilibriert; nach Verwendung wurden Säule und System mit $\text{bd H}_2\text{O}$ und 20 % (v/v) Ethanol gespült. Die Lagerung der Säulen erfolgte in 20 % (v/v) Ethanol. Die verwendeten Puffer, $\text{bd H}_2\text{O}$ und 20 % Ethanol wurden vor Gebrauch sterilfiltriert und entgast. Der Probenauftrag erfolgte entsprechend dem Probenvolumen mit einem Loop geeigneter Größe.

2.4.4.1 Anionenaustauscher

Bei der Ionenaustauscherchromatographie binden Proteine durch elektrostatische Wechselwirkungen an eine Matrix, die im Falle eines Kationenaustauschers negativ geladene Gruppen trägt. Der hier verwendete Anionenaustauscher trägt positiv geladene Gruppen, die mit den – bei dem verwendeten pH-Wert negativ geladenen – Aminosäuren interagieren. Die Stärke der Bindung eines Proteins an den Ionenaustauscher hängt im Wesentlichen von pH-Wert und Ionenstärke des verwendeten Laufpuffers sowie vom isoelektrischen Punktes des Proteins ab.

Für die Anionenaustauscherchromatographie wurde eine selbstgepackte Säule XK16/20 (*GE Healthcare*) mit einem Volumen von 20 mL und als Säulenmaterial Q-Sepharose high performance (*GE Healthcare*) benutzt. Als Säulenpuffer diente Puffer A; die Elution erfolgte durch Anlegen eines linearen Gradienten über vier Säulenvolumina von Puffer A auf Puffer C. Wenn notwendig, konnte durch das Anlegen eines flacheren Gradienten ein besserer Aufreinigungseffekt erzielt werden. Hierzu wurde nach dem Auftrag mit 5 % Puffer D gewaschen, die Elution erfolgte durch lineare Erhöhung von 5 % auf 100 % Puffer D innerhalb von vier Säulenvolumina.

Die Säule wurde mit einer Flussrate von 1 mL/min betrieben. Die gesammelten Fraktionen wurden anhand eines SDS-PAGE-Geles auf Proteinkonzentration und Reinheit untersucht und Fraktionen, die das gewünschte Protein enthielten, vereinigt.

2.4.4.2 Größenausschlusschromatographie

Bei der Größenausschlusschromatographie beruht die Trennung der Proteine voneinander darauf, dass diese sich entsprechend ihrer Größe unterschiedlich zwischen einer Gelmatrix definierter Porengröße und dem umgebenden Medium verteilen.

Für die Präparation kleinerer Proteinmengen und für analytische Zwecke wurde eine Superdex 200 HR10/30-Säule bzw. Superdex 200 10/300 GL (beide ca. 23 mL) (*GE Healthcare*) benutzt, für größere Proteinmengen eine selbstgegossene XK16/70-Säule (ca. 130 mL) des gleichen Säulenmaterials. Um eine möglichst hohe Trennwirkung zu erzielen, wurden Probenvolumina aufgetragen, die 1-2 % des Säulenvolumens betragen, und mit einer Flussrate von 0.25-0.5 mL/min (HR10/30, 10/300 GL) bzw. 0.5 mL/min (XK16/70) gearbeitet. Als Laufpuffer wurde Puffer B verwendet. Nach Kontrolle von Reinheit und Konzentration durch SDS-PAGE wurden die Fraktionen, die das Protein in ausreichender Reinheit enthielten, vereinigt.

2.4.4.3 Entsalzung mittels PD-10-Säule

Bei PD-10-Säulen (*GE Healthcare*) handelt es sich um gepackte 5 mL *gravity flow* Größenausschlusschromatographiesäulen mit SephadexTM G-25 Material. Aufgrund des geringen Trennbereiches des Materials passieren globuläre Komponenten mit einem Molekulargewicht < 5 kDa, wie z.B. Proteine, die Säule sehr schnell, während Komponenten mit einem Molekulargewicht von < 1 kDa, wie z.B. Salze, die Säule langsam durchlaufen. Diese Methode wurde daher zum Umpuffern bzw. Entsalzen von Proteinproben verwendet. Nach der Equilibrierung der PD-10-Säule mit 25 mL Elutionspuffer wurden 2.5 mL der Proteinlösung in Auftragspuffer auf die Säule gegeben und der Durchfluss verworfen. Die Eluierung des Proteins erfolgte mit 3.5 mL Elutionspuffer.

2.4.5 Ultrafiltration

Für die Ankonzentrierung größerer Proteinmengen wurden Amicon ultra Konzentratoren (4 bzw. 15 mL Fassungsvermögen) mit einem Ausschlussvolumen von 10 oder 30 kDa von *Millipore* verwendet. Die Konzentrierung erfolgte durch Zentrifugation bei 1500 g (30 kDa) bzw. 3000 g (10 kDa).

Geringe Proteinmengen wurden in Vivaspin Konzentratoren (*Vivascience*) mit 0.5 mL Fassungsvermögen bei 12000 g aufkonzentriert.

2.4.6 Dialyse

Die Methode der Dialyse wurde entweder zur Entsalzung von Proteinproben in präparativem Maßstab oder zur Präparation von apo-Protein eingesetzt.

Bei der Entsalzung in präparativem Maßstab wurden etwa 30 mL Proteinlösung in einen Snake-SkinTM Dialyseschlauch mit einem Ausschlussvolumen von 3.5 kDa (*Pierce*) gefüllt und zweimal 8-12 h gegen 5 L Puffer dialysiert. Betrug das Probenvolumen mehr als 30 mL, wurden mehrere Schläuche in demselben Gefäß dialysiert.

2.4.7 Deflavinierung

Apo-Protein wurde durch die Anwendung von Entfaltungs/Rückfaltungsprotokollen [116] präpariert, die sich im Wesentlichen in der Methode der Entfaltung unterschieden: Diese geschah entweder durch Dialyse gegen denaturierenden Puffer oder durch Fällung mit TCA

[116-118]. Die Rückfaltung erfolgte in beiden Fällen durch Dialyse. Üblicherweise wurde aggregiertes Protein anschließend mittels Gelfiltration abgetrennt.

2.4.7.1 Präparation von apo-Protein durch Dialyse

Wurden nur geringe Mengen apo-Protein benötigt, wurde die Dialyse in einer Slide-A-Lyzer® Dialysekassette mit einem Ausschlussvolumen von 3.5 kDa (*Pierce*) durchgeführt. Hierzu wurden 1-3 mL Proteinlösung einer Konzentration von 1 mg/mL mit einer Kanüle in die vorgequollene Dialysekassette gegeben und zweimal 8-10 h gegen 200 mL Puffer E dialysiert. Die Rückfaltung erfolgte durch zweimalige Dialyse gegen 200 mL Puffer B für 8-10 h.

Zur Präparation größerer Mengen apo-Protein wurde die zu dialysierende Proteinlösung zunächst mit Puffer E auf eine Konzentration von 1 mg/mL verdünnt und dann 10 mL dieser Verdünnung in einem Snake-Skin™ Dialyseschlauch mit einem Ausschlussvolumen von 3.5 kDa (*Pierce*) dreimal 8-12 h gegen Puffer E dialysiert. Der Schlauch wurde nach sorgfältigem Abspülen mit bid H₂O dreimal für 8-12 h gegen 1.5 L Puffer B dialysiert.

2.4.7.2 Präparation von apo-Protein mittels TCA-Fällung

10 mL einer 1 mg/mL Proteinlösung in Puffer B wurden mit 1 mL 72 % (w/v) TCA-Lösung versetzt, vortexiert und 15 min bei 4000 rpm in einem 15 mL Reaktionsgefäß zentrifugiert. Der gelbe Überstand wurde verworfen und das Pellet mehrmals durch Aufnahme in 5 mL Puffer E und anschließender TCA-Fällung gewaschen. Das nun farblose Pellet wurde in 10 mL Puffer E aufgenommen, in einen Snake-Skin™ Dialyseschlauch mit einem Ausschlussvolumen von 3.5 kDa (*Pierce*) gefüllt und in einem schmalen, hohen Gefäß schrittweise zuerst gegen 400 mL 4 M Guanidiniumchlorid in Puffer B, dann gegen 2 M Guanidiniumchlorid in Puffer B und schließlich gegen 4 L Puffer B für jeweils 8-12 h dialysiert.

2.5 Analytische Methoden

2.5.1 SDS-PAGE

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli [119] diente zur qualitativen Proteinanalyse und zur Reinheitskontrolle des aufgereinigten Proteins. Hierbei bindet sich das Natriumdodecylsulfat unter Ausbildung eines negativ geladenen SDS-Protein-Komplexes fest an das Protein, denaturiert es und unterbindet Protein-Protein-Wechselwirkungen. Aufgrund des Siebeffektes eines Polyacrylamidgeles findet nach dem Anlegen eines elektrischen Feldes eine Auftrennung der Proteine nach ihren molaren Massen statt.

Für die Elektrophorese wurden vertikale Mini-Gelapparaturen der Firma *Hofer Scientific* benutzt. Die Gele wurden mit einem Caster-System gegossen, wodurch gleichzeitig 10-12 Gele erhalten wurden. Aufgrund der Größe des Proteins wurden hauptsächlich 15 % Trenngele und 4 % Sammelgele verwendet, die Zusammensetzung für 10-12 Gele findet sich in Tab. 3. Zur Herstellung der Gele wurde zunächst die Polymerisation des Trenngels durch Zugabe des Radikalstarters Ammoniumperoxodisulfat und des Polymerisationskatalysators TEMED gestartet und die Lösung anschließend in den Caster gegeben. Zur Bildung einer glatten Oberfläche und zur Verhinderung des Austrocknens während der Polymerisation wurde das Trenngel mit Wasser überschichtet, das direkt vor dem Gießen des Sammelgeles wieder entfernt wurde. Nach dem Gießen des analog zum Trenngel hergestellten Sammelgels wurden die Kämme eingesetzt und die Gele nach beendeter Polymerisation bei 4 °C gelagert.

Tab. 3: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel für 15 % SDS-PAGE-Gele.

	Trenngel 15 % (60 mL)	Sammelgel 4 % (50 mL)
Acrylamidlösung	30 mL	6.65mL
dest. H₂O	9.4 mL	32.85 mL
10 % (w/v) SDS	600 µL	600 µL
Trenngelpuffer	20 mL	-
Sammelgelpuffer	-	10 mL
TEMED	60 µL	50 µL
10 % (w/v) APS	300 µL	500 µL

Die angegebenen Mengen beziehen sich auf einen Caster mit 10-12 Minigelen.

Proteine enthaltende Bakteriensuspensionen wurden aus einem Volumen von 1 mL durch Zentrifugation (5000 rpm, 2 min) pelletiert und in 100 µL SDS-PAGE-Probenpuffer resuspendiert, der neben SDS zur Denaturierung und Maskierung der Proteineigenladung auch β -Mercaptoethanol zur Spaltung von Disulfidbrücken enthielt. Proteinproben aus der chromatographischen Aufreinigung wurden mit dem 3-5-fachen Volumen an SDS-PAGE-Probenpuffer versetzt. Alle in SDS-PAGE-Probenpuffer gelösten Proteinproben wurden 5 min bei 95 °C im Wasserbad denaturiert, kurz auf Eis abgekühlt und unmittelbar vor dem Auftragen bei 13000 rpm zentrifugiert. Als Größenstandard diente entweder der peqGOLD Protein-Marker (*peQLab*) oder der Unstained Protein Molecular Weight Marker (*Fermentas*).

Trenngelpuffer

1.125 M Tris/HCl, pH 8.8
30 % (w/v) Saccharose

Sammelgelpuffer

0.625 M Tris/HCl, pH 6.8

10 x SDS-PAGE-Laufpuffer

0.25 M Tris
2 M Glycin
1 % (w/v) SDS

SDS-PAGE-Probenpuffer

62.5 mM Tris/HCl, pH 6.8
15 % (v/v) Glycerin
4 % (w/v) SDS
Spatelspitze Bromphenolblau
4 % (v/v) β -Mercaptoethanol

Die Elektrophorese wurde bei 20 mA durchgeführt, bis die Lauffront aus dem Gel herauslief. Nach der Elektrophorese wurde das Gel in Coomassie Färbelösung [120] durch mehrmaliges kurzes Aufkochen oder alternativ mehrere Stunden unter Schwenken angefärbt. Anschließend wurde das Gel nach Abspülen mit Wasser mit Entfärbelösung 1 h entfärbt. Nach der

vollständigen Entfärbung des Hintergrundes durch mehrstündiges Schwenken in Wasser wurde das Gel in einer Frischhaltefolie aufbewahrt und mit einem Scanner eingescannt.

Färber

0.25 % (w/v) Coomassie Blue R 250

5 % (v/v) Essigsäure

50 % (v/v) Ethanol

1 h rühren lassen und danach abfiltrieren

Entfärber

5 % (v/v) Eisessig

28 % (v/v) Isopropanol

Regenerierung mit Aktivkohle und anschließendem
Filtrieren

2.5.2 Bradford-Assay

Die Konzentration von Proteinlösungen wurde standardmäßig mit Hilfe des Bradford-Testes bestimmt [121]. Durch Bindung des in der Bradford-Lösung (*Biorad*) enthaltenen Farbstoffs Coomassie brilliant blue-G250 an kationische und nichtpolare, hydrophobe Seitenketten der Proteine verschiebt sich dessen Absorptionsmaximum von 465 nm auf 595 nm. Nach Erstellen einer Kalibriergerade mit BSA-Lösungen (0-20 µg/mL) kann man diesen Effekt der Zunahme des Absorptionsmaximums bei 595 nm zur Bestimmung der Proteinkonzentration nutzen.

Um die Konzentration einer Proteinlösung zu bestimmen, wurden 1 µL dieser Lösung zu 1 mL einer filtrierten 1:5 Verdünnung der Stammlösung gegeben. Handelte es sich bei dem zu untersuchenden Proteins um ein Dodecin, wurden zur vollständigen Denaturierung zusätzlich 10 µL 72 %ige (w/v) TCA-Lösung hinzupipettiert. Nach 5-minütiger Inkubation bei RT wurde die Absorption bei 595 nm gegen eine Vergleichslösung ohne Protein gemessen und anhand der Kalibriergeraden die Proteinkonzentration bestimmt.

2.5.3 BCA-Assay

Zur genaueren Bestimmung der Proteinkonzentration wurde der BCA-Assay benutzt, der auf der Biuret-Reaktion [122] beruht. Dieser kolorimetrische Assay ist sensitiver und weniger

empfindlich gegenüber Störungen durch andere Reagentien und basiert auf der Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^+ durch Peptidbindungen im Protein. Das entstehende Cu^+ -Ion wird durch die im Reagenz enthaltene Bicinchonin-Säure unter Bildung eines violettfarbenen Komplexes chelatisiert.

Um die Konzentration einer Proteinprobe zu bestimmen, wurden in einer Doppelbestimmung 2 μL einer geeigneten Proteinverdünnung mit bid H_2O auf 50 μL verdünnt und mit 1 mL frisch angesetzter BCA-Lösung (*Pierce*) versetzt. Nach 30-minütiger Inkubation bei 37 °C wurde die Absorption bei 562 nm gemessen. Durch die gleichzeitige Bestimmung der Absorption von BSA-Standards im Konzentrationsbereich von 0.05–1 mg/mL konnte nach Erstellen einer Kalibriergeraden die gewünschte Proteinkonzentration ermittelt werden.

2.5.4 Bestimmung von Kofaktorkonzentrationen

Kofaktorkonzentrationen freier Flavine wurden spektroskopisch durch Anwendung des Lambert-Beerschen-Gesetzes unter Verwendung folgender Extinktionskoeffizienten in Puffer B ermittelt: $\epsilon_{450} = 11300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ für FAD, $\epsilon_{448} = 12600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ für FMN, $\epsilon_{448} = 12300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ für Riboflavin, $\epsilon_{444} = 10900 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ für Lumiflavin [123] und $\epsilon_{354,5} = 8200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ für Lumichrom [124].

2.5.5 Ellman-Assay

Die Konzentration des Dodecin-gebundenen CoAs wurde mittels des Ellman Assay [125] bestimmt. In Anwesenheit freier Thiole wird das symmetrische Aryl Disulfid 5,5-dithiobis(2-nitrobenzoat) (DTNB, Ellmans Reagenz, *Fluka*) quantitativ zum 2-nitro-5-thiobenzoat (TNB) umgesetzt. Diese Reaktion kann photometrisch durch Messen der Absorption bei 412 nm verfolgt werden.

Hierzu wurden in einem 1.5 mL Reaktionsgefäß 20–40 μM Proteinlösung und 500 μM Ellmans Reagenz in Puffer E gemischt. Nach 5 min Inkubation bei 37 °C wurde die OD_{412} gegen Puffer gemessen. Da sowohl das Ellmans Reagenz als auch die Proteinlösung bei 412 nm absorbieren, wurden die OD_{412} von Ellmans-Reagenz und Protein einzeln ermittelt und von der zuvor bestimmten OD_{412} subtrahiert. Aus der so ermittelten OD_{412} wurde mit dem Extinktionskoeffizienten von $13700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (TNB in Guanidiniumchlorid, www.bio.net/bionet/mm/methods/1994-October/020180.html) die Konzentration der freien Thiolgruppe des CoAs berechnet.

2.5.6 HPLC-ESI-MS

Die Methode der HPLC-ESI-MS (high pressure liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry) wurde sowohl zur Identifizierung der endogen gebundenen Kofaktoren als auch zur Bestimmung der molaren Massen der aufgereinigten Proteine verwendet. Die HPLC diente auch zur präparativen Aufreinigung des Kofaktors Lumichrom.

Zur Identifizierung der endogen gebundenen Kofaktoren wurden diese zunächst durch TCA-Fällung aus dem Protein extrahiert. Dazu wurden 100 µL einer Proteinlösung (c=5-10 mg/mL) mit 10 µL einer 72 %igen (w/v) TCA-Lösung versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Denaturiertes Protein wurde durch Zentrifugation (30 min, 5000 rpm, 4 °C) pelletiert und der farbige Überstand bis zur Analyse lichtgeschützt aufbewahrt. 50-100 µL des Überstandes wurden auf eine 125/2 Nucleodur C18 Gravity-Säule mit einer Partikelgröße von 3 µm (*Macherey & Nagel*) aufgetragen und an dem HPLC-Gerät 1100 Series (*Agilent*) mit einer Flussrate von 0.2 mL/min bei folgendem Wasser/Methanol Lösungsmittelgradienten eluiert (siehe Tab. 4):

Tab. 4: HPLC-Elutionsgradient zur Bestimmung der endogen gebundenen Kofaktoren

min	% Methanol
0	10
22	61.3
23	95
25	95
26	10
30	10

Zur besseren Ionisierbarkeit für die anschließende MS-Analyse enthielt das Laufmittel 2 mM Triethylamin. Das Elutionsverhalten wurde durch Messen der Absorption bei 215 nm detektiert und die Masse durch ESI-MS im Negativmodus analysiert.

Zur Bestimmung der molaren Massen wurden die Proteinlösungen nach Entsalzung durch HPLC unter Verwendung einer 10 x 2 mm C4-Säule (*Macherey & Nagel*) mittels ESI-TOF an einem Q-Star Pulser (*Applied Biosystems*) im Positivmodus vermessen.

Der für die Fluoreszenztitration verwendete Ligand Lumichrom wurde vor Gebrauch über HPLC aufgereinigt, um Verunreinigungen zu beseitigen. Die in Chloroform gelöste Lumichromlösung wurde hierzu auf eine 125/2 Nucleodur C18 Gravity-Säule mit einer Partikelgröße von 3 μm - angeschlossen an ein 1100 HPLC-System (*Agilent*) mit Fraktionskollektor - aufgetragen. Die Elution erfolgte bei einer Säulentemperatur von 40 °C mit einer Flussgeschwindigkeit von 0.2 mL/min bei einem linearen Gradienten (10 auf 80 % Methanol/0.1 % TFA in Wasser/0.1 %TFA innerhalb von 25 min). UV-absorbierende Fraktionen wurden mittels ESI-MS auf Vorhandensein und Reinheit von Lumichrom überprüft. Geeignete Fraktionen wurden vereinigt, unter flüssigem Stickstoff schockgefroren und mehrere Tage lyophilisiert.

2.5.7 Absorptionsspektroskopie

Für die Aufnahme von Absorptionsspektren wurde ein Ultrospec 3100 Spektrophotometer (*GE Healthcare*) bei RT verwendet. Spektren wurden von 200-700 nm mit einer Scanrate von 350 nm/min und 0.5 nm Schritten aufgenommen. Pufferspektren wurden unter identischen Bedingungen aufgenommen und anschließend subtrahiert.

2.5.8 Bestimmung von Extinktionskoeffizienten

Da die Bindung von Flavinkofaktoren an Dodecine die Extinktion der Flavine ändert, war es notwendig, modifizierte Extinktionskoeffizienten zu ermitteln.

Zur Bestimmung der Protein-gebundenen Flavin-Extinktionskoeffizienten wurden 100 μL einer Flavin-haltigen Dodecinlösung mit einer OD_{448} von etwa 5.0 in einem 1.5 mL Reaktionsgefäß mit 900 μL Puffer B und 100 μL 72 % (w/v) TCA verdünnt und gut durchmischt. Nach 30-minütiger Inkubation unter Lichtausschluss auf Eis wurde der Ansatz 30 Minuten bei 5000 rpm zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Parallel wurden 100 μL der gleichen Dodecinlösung mit 1 mL Puffer versetzt und 1 h auf Eis inkubiert. Zur Minimierung von Pipettierfehlern wurden jeweils drei Ansätze zusammenpipettiert. Um ebenso den Einfluss von TCA auf das Absorptionsverhalten von FMN bzw. FAD zu berücksichtigen, wurde analog mit der reinen Flavin-Lösung verfahren. Anschließend wurden Absorptionsspektren wie unter 2.5.7 beschrieben aufgenommen.

Unter Berücksichtigung der Literaturwerte [123] für freies Flavin ($\epsilon_{\text{Rib}, 448}=12300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $\epsilon_{\text{FMN}, 448}=12600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $\epsilon_{\text{FAD}, 450}=11300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) konnten die Protein-gebundenen Flavin-

Extinktionskoeffizienten durch Anwendung des Lambert-Beerschen Gesetzes bestimmt werden.

2.5.9 Fluoreszenzspektroskopie

Für alle fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen wurden Flavine (*Sigma*) einer Reinheit von >95 % verwendet. Lumichrom (*Aldrich*) wurde vorher mittels HPLC aufgereinigt.

2.5.9.1 Fluoreszenzemissionsspektren

Fluoreszenzemissionsspektren wurden zum einen zur Bestimmung des Einflusses der Proteinumgebung auf die gebundenen Kofaktoren (Fluoreszenzquench), zum anderen als Vortests für Fluoreszenztitrationen durchgeführt.

Für die Aufnahme von Fluoreszenzemissionsspektren an einem FP-6500 Spektrofluorometer (*Jasco*), ausgestattet mit einem ETC-273T Peltier-Element, bei 20 °C wurden klarfiltrierte Kofaktorlösungen oder Kofaktor-enhaltende Proteinlösungen einer Flavinkonzentration von 0.2-5 µM in Puffer B in einer 200 µL Quarzglasküvette verwendet. Je nach enthaltenem Flavinkofaktor wurde entweder bei 450 nm (FAD, FMN, Riboflavin und Lumiflavin) bzw. 380 nm (Lumichrom) Excitationswellenlänge angeregt und ein Emissionsspektrum von 460-700 nm (FAD, FMN, Riboflavin und Lumiflavin) bzw. 420-600 nm (Lumichrom) mit einer Leseratte von 1000 nm/min aufgenommen.

2.5.9.2 Fluoreszenztitration

Der auftretende Fluoreszenzquench bei der Bindung von Flavinen an Dodecine kann zur Bestimmung der apparenten Dissoziationskonstanten des Flavin-Dodecin-Komplexes herangezogen werden.

Eine Methode zur Bestimmung der apparenten Dissoziationskonstanten ist die Fluoreszenztitration, bei der die abnehmende Flavinfluoreszenz in Abhängigkeit von der steigenden Proteinkonzentration detektiert wird. Nach dem Auftragen der relativen Fluoreszenz gegen die Proteinkonzentration kann die apparente Dissoziationskonstante K_D dann durch Fitten der erhaltenen Dissoziationskurve an eine 1:1 Bindungskurve erhalten werden:

$$F_{meas} = c_{total} \cdot F_{free} + \left(\sqrt{\frac{(r_{total} + c_{total} + K_D)^2}{4} - c_{total} \cdot r_{total}} - \frac{r_{total} + c_{total} + K_D}{2} \right) \cdot (F_{free} - F_{bound})$$

Die Variablen c_{total} und r_{total} stehen für die Flavin- und Proteinkonzentrationen zu jedem Titrationspunkt. F_{free} ist die Fluoreszenz des freien, F_{bound} die Fluoreszenz des gebundenen Flavins. F_{meas} bezeichnet die gemessene Fluoreszenz und K_D steht für die Dissoziationskonstante.

2.5.9.3 Fluoreszenztitration durch manuelles Pipettieren

Bei dieser Methode wurden Protein- und Flavinlösung in verschiedenen Verhältnissen gemischt, inkubiert und schließlich die Emission gemessen. Hierbei wurden 0.5 μ M (bzw. 5 μ M) FMN mit 0.1 μ M-2.5 μ M (bzw. 1-25 μ M) Dodecinlösung in einem Gesamtvolumen von 1 mL versetzt, die Mischung für wenige Stunden inkubiert und dann in einer 200 μ L Quartzküvette die Emission bei 530 nm nach Excitation bei 450 nm gemessen. Verwendet wurden Lösungen von apo-Dodecin, das frisch durch Dialyse entfaltet und zurückgefaltet wurde.

2.5.9.4 Fluoreszenztitration durch Verwendung einer Titrationseinheit

War das Fluoreszenzspektrometer mit dem ETC-273T Peltier-Element ausgestattet, das auch über eine Rühreinheit verfügte, konnten Fluoreszenztitrationen direkt in der Küvette durch Zugabe von Dodecinlösung zu einer Flavinlösung durchgeführt werden.

In einem typischen Titrationsexperiment wurden 1 mL einer 200 nM Flavinlösung mit 4 μ L Aliquots einer 11.5 μ M Dodecinlösung, das bereits endogenes FMN gebunden hatte, in einer 2 mL Rundküvette alle 2 min bis zur Sättigung titriert. Für FMN, Riboflavin und Lumiflavin wurde die Emission bei 529 nm nach Excitation bei 450 nm mit mittlerer Empfindlichkeit und Spaltbreiten von 10 nm (Emission und Excitation) gemessen. Im Falle des FADs erfolgte die Detektion der Emission bei 532 nm. Die Emission von Lumichrom wurde bei 460 nm nach Anregung bei 380 nm gemessen. Aufgrund der geringeren FAD- und Lumichrom-Fluoreszenz bei pH 8.0 wurde die Emission bei hoher Empfindlichkeit und Spaltbreiten von 5 nm (Excitation) und 10 nm (Emission) bestimmt.

Zur Korrektur der gemessenen Daten um die Fluoreszenz des bereits gebundenen FMNs, wurde eine Titration von Puffer mit FMN enthaltendem Dodecin unter analogen Bedingungen

durchgeführt. Da Experimente zeigten, dass sich die Verdünnung der Flavinfluoreszenz annähernd linear verhält, wurde die gemessene Fluoreszenz außerdem rechnerisch um den Verdünnungsfaktor korrigiert. Nach Normierung auf die Anfangsfluoreszenz des freien Flavins wurden die resultierenden relativen Fluoreszenzen gegen die Konzentration des freien Dodecins aufgetragen und die Dissoziationskonstante K_D wie oben beschrieben ermittelt.

2.5.9.5 Fluoreszenztitration zur Bestimmung der Zeitabhängigkeit

Bei den Messungen zur Untersuchung des zeitabhängigen Effektes der FMN-Bindung an das apo-Dodecin wurden 600 μL FMN einer Konzentration von 2 μM einmalig mit 100 μL einer 100 μM apo-Dodecinlösung titriert. Das verwendete apo-Dodecin wurde zuvor zur Deflavinierung einer TCA-Fällung unterzogen, unter Dialyse zurückgefaltet und dann über Nacht bei 20 °C mit 2 μM FMN inkubiert, um die Abnahme der FMN Fluoreszenz um den Anteil der Verdünnung während der Messung vernachlässigen zu können. Fluoreszenzemissionsspektren wurden vor der Titration, 5 Minuten nach Injektion und dann alle 30 Minuten bei Spaltbreiten von 5 nm (Excitation und Emission) mit mittlerer Empfindlichkeit und einer Leserate von 1000 nm/min aufgenommen. Für Messungen des kinetischen Effektes wurden diese Messungen bei 20, 37, 50 und 65 °C durchgeführt. Nach Auftragen der relativen Fluoreszenz gegen die Zeit wurden die Halbwertszeiten durch Fitten der Kurven gegen die Funktion des exponentiellen Zerfalls $y = c + y_0 e^{-k}$ mit Hilfe der Formel

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k}$$

(mit k =Geschwindigkeitskonstante in $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $t_{1/2}$ =Halbwertszeit in min) ermittelt.

Da die Bindungsgeschwindigkeit von der Temperatur abhängig ist, gilt hier die empirisch ermittelte Arrhenius-Gleichung

$$k = k_0 + A e^{-\frac{E_a}{RT}}$$

mit A = präexponentieller Faktor, k =Geschwindigkeitskonstante in $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$, E_a =Aktivierungsenergie in kJ mol^{-1} , R =Gaskonstante= $8.31441 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$, T =Temperatur in K.

Durch Bildung des natürlichen Logarithmus ergibt sich

$$\ln k = \ln k_0 - \frac{E_a}{R} \cdot \frac{1}{T}$$

so dass man nach Auftragen von $\ln k$ gegen $1/T$ eine Gerade mit dem Achsenabschnitt $\ln k_0$ und der Steigung $-E_a/R$ erhält. Durch Multiplikation der Steigung mit der Gaskonstanten R ergibt sich die Aktivierungsenergie E_a .

2.5.10 Isothermale Titrationskalorimetrie

Die isothermale Titrationskalorimetrie (ITC) ist eine Methode zur Bestimmung von thermodynamischen Größen bei einer Assoziation wie z.B. der Ausbildung einer Protein-Ligand-Wechselwirkung [126-128].

Ein ITC-Gerät besteht aus zwei identischen Zellen, einer Messzelle und einer Referenzzelle konstanter Temperatur, die von einem adiabatischen Mantel umgeben sind. Die Temperaturdifferenz zwischen diesen beiden Zellen wird kontinuierlich überwacht. Wird nun in die Protein-enhaltende Messzelle eine Ligandlösung hinzugefügt, wird entweder Wärme freigesetzt oder aufgenommen, je nachdem, ob es sich um eine exotherme oder endotherme Reaktion handelt. Diese Temperaturänderung in der Messzelle wird durch einen sehr empfindlichen Feedback-Mechanismus registriert und durch Änderung der Heizleistung der Messzelle ausgeglichen, so dass diese wieder die gleiche Temperatur wie die Referenzzelle aufweist. Diese von außen zugesetzte oder abgeführte Wärme ist der eigentliche Messwert, aus dem sich thermodynamische Größen, wie die Freie Energie ΔG , die Enthalpie ΔH , die Entropie ΔS , die Bindungskonstante K_B und die Stöchiometrie n der Reaktion bestimmen lassen.

ITC-Messungen wurden an einem MCS-ITC-Gerät der Firma *MicroCal* bei 25 °C durchgeführt. Bei einem typischen Titrationsexperiment wurde die Reaktionszelle (Volumen 1.351 mL) mit Protein gefüllt und der Ligand FMN innerhalb von 25 Injektionen nach Equilibrierung beider Lösungen hinzutitriert. Das Volumen der ersten Injektion betrug 1.50 μL , alle übrigen Injektionsvolumina betrugen 10.02 μL , wobei zwischen den einzelnen Injektionen jeweils 5 min lagen. Zur Vermeidung von Luftblasen, die die Volumina verfälscht hätten, wurden sowohl Protein- als auch Ligandlösung direkt vor der Messung unter Rühren im Membranpumpenvakuum entgast. Die erhaltenen Rohdaten wurden integriert, um nichtspezifische Wärmeeffekte korrigiert [126] und unter Annahme eines 1:1 Bindungsmodells gefittet. Hierzu wurde die OriginTM 5.0 Software (*OriginLab Corporation*) verwendet.

2.5.11 CD-Spektroskopie

CD-Spektroskopie beruht auf der unterschiedlichen Absorption der links- und rechts-zirkular polarisierenden Komponente linear polarisierten Lichtes durch chirale Chromophore [129]. Diese Chiralität kann entweder aufgrund der Struktur intrinsisch sein oder durch Anwesenheit einer asymmetrischen Umgebung hervorgerufen werden.

Circulardichroismus-Spektroskopie im fernen UV-Bereich wurde in dieser Arbeit hauptsächlich zur Untersuchung von Konformationsänderungen, wie sie zum Beispiel bei der Denaturierung von Proteinen auftreten, verwendet. Des weiteren dienten CD-Messungen im UV-VIS Bereich der Untersuchung der Protein-FMN-Wechselwirkung.

CD-Messungen wurden an einem J-810 CD-Spektrometer (*Jasco*) ausgestattet mit einem PTC-423S-Peltier Element in einer Quarzküvette mit einer Schichtdicke von 0.1 cm (*Hellma*) bei 20 °C durchgeführt. Für Messungen im fernen UV-Bereich besaßen die Proteinlösungen üblicherweise Konzentrationen im Bereich von 10-25 µM in 10 mM Tris/HCl, pH 8.0. Für die Aufnahme der UV-VIS CD-Spektren wurden Lösungen einer Konzentration von 100 µM-240 µM verwendet.

CD-Spektren im fernen UV-Bereich wurden von 190-280 nm in 0.2 nm Schritten bei einer Scanrate von 100 nm/min und 3-5 Akkumulationen aufgenommen. UV-VIS-Spektren wurden von 700-260 nm in 0.1 nm Schritten mit einer Scanrate von 50 nm/min aufgenommen und die Daten von 10 Messungen akkumuliert.

Schmelzkurven zur Bestimmung des Schmelzpunktes wurden durch Aufnahme der Elliptizitäts-Änderungen bei einer Wellenlänge von 198 nm bei kontinuierlicher Erwärmung von 20 auf 95 °C in Schritten von 2 °C/min gemessen.

2.5.12 Reduktion

2.5.12.1 Reduktion mit Natriumdithionit

Um den reaktiven Gehalt des verwendeten Reagenzes Natriumdithionit zu bestimmen, wurde zunächst eine Titration unter anaeroben Bedingungen von Natriumdithionit mit Kaliumhexacyanoferrat(III) durchgeführt. Das reduzierte Produkt Kaliumhexacyanoferrat(II) lässt sich durch Messen der Abnahme der Extinktion bei 420 nm detektieren.

Hierzu wurden 1 mL einer 1 mM Kaliumhexacyanoferrat(III)-Lösung in Puffer B unter anaeroben Bedingungen in einem Stickstoffzelt mit jeweils 10 µL Natriumdithionitlösung (2 mg/mL) in einer Quarzküvette titriert und die Extinktion bei 420 nm nach jedem Titrationsschritt gemessen. Mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten $\epsilon_{420}=1.02 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ließ

sich die Konzentration des gebildeten Kaliumhexacyanoferrats(II) und somit die Konzentration der übertragenen Elektronen bestimmen.

Für die Reduktion des Dodecin-gebundenen FMNs wurde durch Lösen in anaerobem Puffer 1 mL einer 0.1 mM Proteinlösung hergestellt und diese unter anaeroben Bedingungen im Stickstoffzelt mit jeweils 10 µL Natriumdithionit (dies entsprach einer Konzentration von 3.33 mM Elektronen) versetzt. Zur Detektion der gebildeten reduzierten oder semireduzierten Flavinspecies wurde ein Absorptionsspektrum von 300-650 nm unter anaeroben Bedingungen aufgenommen.

2.5.12.2 Photoreduktion

Zur Katalyse der Photoreduktion des Dodecin-gebundenen FMNs wurde 5'-Deazaflavin verwendet. Unter anaeroben Bedingungen wurden in einer 1 mL Quarzküvette 0.1 mM Dodecin und 0.001 mM 5'-Deazaflavin in Puffer B in einem Volumen von 1 mL gelöst. Die Küvette wurde mit einem Gummistopfen verschlossen und mit Alufolie umwickelt. Nach der Aufnahme eines Dunkelspektrums von 300-700 nm an einem HP 8453 Dioden-Array-Spektrometer (*Hewlett Packard*) wurde die Probe für 6 min mit einem handelsüblichen Diaprojektor belichtet und jede Minute ein Spektrum aufgenommen. Das Referenzspektrum von Puffer und 5'-Deazaflavin wurde jeweils subtrahiert. Die Rückoxidation des Protein-gebundenen Flavins erfolgte durch Öffnen der Küvette.

2.5.12.3 Reduktion mit Titan(III)citrat

Unter anaeroben Bedingungen wurde im Stickstoffzelt in einer 1 mL Quarzküvette eine 0.1 mM Dodecinlösung in Puffer B mit Stickstoff gespült und die Küvette mit einem Stopfen verschlossen. Unter ebenfalls anaeroben Bedingungen wurden 20 µL einer 1 mM Titancitratlösung nach Holliger [130] in eine Hamiltonspritze gefüllt. Nach Aufnahme eines Absorptionsspektrums des Dodecin-gebundenen FMNs an einem HP 8453 Dioden-Array-Spektrometer (*Hewlett Packard*) im Bereich von 300-700 nm wurde die Proteinlösung mit der Titancitratlösung mit Hilfe der Spritze durch den Gummistopfen hindurch versetzt. Der Verlauf der Reaktion wurde durch die Aufnahme von Absorptionsspektren beobachtet. Die Rückoxidation des Protein-gebundenen Flavins erfolgte durch Entfernen des Gummistopfens. Die Spektren von Puffer und Titan(III)citrat wurde jeweils subtrahiert.

Um zu untersuchen, welches Protein zu Titancitrat-Verhältnis zur Bildung einer detektierbaren Semiquinonkonzentration führte, wurde eine Titration des Dodecin-gebundenen Flavins mit Titan(III)citrat durchgeführt. Hierzu wurde unter anaeroben Bedingungen in einer 1 mL Quarzküvette 1 mL einer 0.2 mM Proteinlösung in Puffer B mit Stickstoff gespült und die Küvette mit einem Gummistopfen verschlossen. Unter ebenfalls anaeroben Bedingungen wurden eine 2 mM und eine 7.3 mM Titan(III)citratlösung durch Verdünnen in Puffer hergestellt. Insgesamt 19 Injektionen von 5-25 μ L einer 2 bzw. 7.3 mM Titan(III)citratlösung wurden bis zur Sättigung mit Hilfe einer Hamiltonspritze zu der Proteinlösung hinzutitriert und die OD₄₅₂ gemessen. Blindspektren von Puffer und Titancitrat wurden subtrahiert.

2.5.12.4 Reduktion durch Röntgenstrahlung

Reduktion durch Röntgenstrahlung wurde an der Beamline ID14-2 (ESRF; Grenoble, Frankreich) mit Hilfe eines online eingebauten Mikrospektralphotometers (ausgestattet mit einer DH2000 Lichtquelle, einem HR2000 Detektor und einer Glasfaseroptik, alles *Ocean Optics*) durchgeführt. Eine solche Versuchsanordnung erlaubt die Absorptions- oder Fluoreszenzmessung von Intermediaten in Echtzeit – wie sie z.B. bei redox- oder photoaktiven Proteinen auftreten. Benötigt werden hierfür große, jedoch dünne Kristalle.

Die Bestrahlung erfolgte bei einer Temperatur von 100 K mit $8.1 \cdot 10^{10}$ Photonen pro Sekunde bei einer Spaltbreite von $0.1 \cdot 0.1$ nm und einer Wellenlänge von 0.933 Å. Alle 1.843 s wurde ein Absorptionsspektrum von 188.39-1097.58 nm in 0.41 nm-Schritten aufgenommen. Außerdem wurden die Absorptionen bei den Wellenlängen 380, 450, 490, 545 und 600 nm in unterschiedlichen Kanälen über den gesamten Zeitraum verfolgt.

2.5.13 EPR-Spektroskopie

Die EPR- (paramagnetische Elektronenresonanz-) Spektroskopie ist eine Hochfrequenzspektroskopiemethode, die Einblicke in die Struktur und Dynamik paramagnetischer Moleküle liefert [131-133]. Zur EPR-spektroskopischen Untersuchung von Proteinen bzw. deren Kofaktoren müssen diese mindestens ein ungepaartes Elektron besitzen. In Proteinen treten paramagnetische Moleküle entweder als Radikale, die infolge von Elektronentransferprozessen entstehen, als Übergangsmetallkomplexe oder als Moleküle im Triplettzustand auf.

Bei der ENDOR-Spektroskopie (Elektron-Kern-Doppelresonanz) wird die Elektronenspinresonanz (EPR) mit der Kernspinresonanz (NMR) kombiniert. Auf diese Weise ist die ENDOR-Spektroskopie in der Lage, Wechselwirkungen von paramagnetischen Elektronen mit seinen Nachbaratomen zu messen.

Vortests zur Probenvorbereitung

Hierzu wurde unter anaroben Bedingungen in einem 1.5 mL Reaktionsgefäß im Stickstoffzelt 1 mL einer 0.2 mM sowie eine 2 mM und eine 7.3 mM Titan(III)citratlösung in Puffer B mit Stickstoff gespült hergestellt. Analog der photometrisch verfolgten Reduktion (siehe 2.5.12.3) wurde die Proteinlösung mit einer entsprechenden Menge Titan(III)citrat versetzt und zum Zeitpunkt 0 %, 25 %, 50 %, 75 % Reduktion sowie dem Sättigungszustand jeweils eine Probe von 200 µL für die Aufnahme von EPR-Spektren entnommen.

Probenvorbereitung

Für die Aufnahme eines EPR-Spektrums wurden 50 µL Dodecin (246 µM Endkonzentration) mit 120 µL Titan(III)citrat (480 µM Endkonzentration) unter anaeroben Bedingungen direkt in einem EPR-Röhrchen mit dem Durchmesser von 4 mm (erhalten von Erik Schleicher) versetzt. Nach 10 Minuten Inkubation wurde die Probe in flüssigem Stickstoff weggefroren und bis zur Messung unter flüssigem Stickstoff gelagert. Für erste Messungen in Marburg wurden Röhrchen aus hochreinem Quarzglas (Ilmasil-PN, *Quarzschmelze Ilmenau GmbH*), mit einer Wandstärke von 0.45 ± 0.05 mm, einen Außendurchmesser von 4.7 ± 0.2 mm und eine Länge von 13 cm verwendet. Die gefüllten Röhrchen wurden mit einem ca. 3 cm langen Latexschlauch, der seitlich eingeschnitten worden war, versehen und dann mit einem Plastikstab verbunden. Nach Einfrieren der gefüllten Probe wurde sie bis zur Messung in flüssigem Stickstoff gelagert.

Aufnahme von EPR-Spektren

Die Aufnahme erster EPR-Spektren erfolgte unter Zusammenarbeit mit Antonio Pierik (Fachbereich Biologie) an einem EMX-6/1 X-Band-EPR-Spektrometer (*Bruker*) bei 77 K, 20 µW und 1 mT mod. Amplitude.

Transiente EPR Spektren wurden von Erik Schleicher an einem selbstgebauten X-Band Spektrometer mit Laseranregung durchgeführt, welches im Detail in der Literatur beschrieben ist [134]. Die unterschiedlichen Dodecin-Proben wurden mittels Ultrafiltrationszellen bis zu einer Konzentration von 0.5 mM aufkonzentriert, mit 50 % (v/v) Glycerin versetzt und

schockgefroren. Die Proben wurden im Dunklen in das Spektrometer transferiert und Spektren bei 80 K aufgenommen.

X-band gepulste ENDOR-Spektren wurden von Erik Schleicher und Stefan Weber (Universität Freiburg) an einem gepulsten Bruker E580 EPR Spektrometer (*Bruker BioSpin GmbH*) mit einem dielektrischen-Ring-Bruker ENDOR Resonator (Bruker ER 4118X-MD5-EN) aufgenommen. Für ENDOR-Spektren, die nach der Pulssequenz von Davies [135] aufgenommen wurden, wurde eine Mikrowellen-Pulssequenz π -t- $\pi/2$ - τ - π , bei der 64 ns und 128 ns $\pi/2$ und π -Pulse benutzt und ein Radiofrequenz-Puls mit einer Dauer von 10 μ s gemessen ab 1 μ s nach dem ersten Mikrowellen-Puls verwendet. Die Zeitabstände t und τ zwischen den Mikrowellenpulsen betrug jeweils 13 bzw. 348 ns. Um Sättigungseffekte aufgrund langer Relaxationszeiten der Flavinradikale zu vermeiden, wurde die komplette Pulssequenz mit einer Frequenz von nur 400 Hz wiederholt.

2.6 Proteinkristallisation

Der erste Schritt auf dem Weg zu einer Röntgenstrukturbestimmung von Proteinen besteht im Züchten von Proteinkristallen, wobei die Schwierigkeit darin besteht, dass die Bedingungen, unter denen ein Kristall entsteht, nicht rational bestimmt werden können, sondern allein auf empirischen Methoden beruhen. Kristallbildung und -wachstum eines Proteins wird zudem durch viele verschiedene Faktoren wie Temperatur, pH-Wert, Pufferart, Konzentration und Art des Fällungsmittels, Ionenstärke sowie Konzentration und Reinheit des Proteins beeinflusst.

Um mit möglichst wenig Aufwand reproduzierbare Kristalle zu erhalten, wurden kommerziell erhältliche Screens entwickelt, die auf bereits bekannten Kristallisationsbedingungen basieren [136]. Durch Verwendung dieser *sparse matrix screens* können meist schon erste Voraussagen über das Kristallisationsverhalten unter bestimmten Bedingungen getroffen werden.

Bei besonders leicht zu kristallisierenden Proteinen ist es möglich, dass schon nach einem einzigen Screen Einkristalle gewachsen sind, deren Streukraft zum Sammeln eines Datensatzes ausreicht. Oft müssen jedoch die ursprünglichen Screenbedingungen durch Anlegen eines Rasters um die entsprechende Bedingung herum durch Variation von Parametern wie pH-Wert, Fällungsmittelkonzentration etc. optimiert werden, um so größere, regelmäßiger und besser streuende Kristalle zu erhalten.

Zusätzlich zu den verwendeten Kristallisationslösungen lassen sich auch verschiedene Methoden anwenden, um eine Optimierung der Bedingungen zu erzielen. Zu den am meisten verwendeten Methoden gehören die *hanging-drop*- und die *sitting-drop*-Methode. Beide Methoden beruhen auf Dampfdiffusion: Dem Tropfen bestehend aus Protein und Reservoirlösung wird durch Dampfdiffusion Wasser entzogen, und es stellt sich zwischen dem Tropfen und dem Reservoir ein Gleichgewicht ein. Durch den Entzug von Wasser kommt es zur Erhöhung von Protein- und Fällungsmittelkonzentration, die im Idealfall zur Bildung eines Proteinkernes und zum Kristallwachstum führt.

2.6.1 Screening

Erste Kristallisationsscreens wurden entweder im 24well-Format nach der *hanging-drop*-Methode oder im 96well-Format unter Verwendung eines Kristallisationsroboters nach der *sitting-drop* Methode durchgeführt.

Wurde der Roboter für ein Screening verwendet, wurden jeweils 100 µL der Reservoirlösung in Crystal Quick 96TM round well (*Greiner Bio-one*)-Platten bzw. 80 µL in InnovaplateTM-SD2-Platten (*Innovadyne Technologies*) mit einer Multipette pipettiert. Der Kristallisationsroboter (*CartesianTM Microsys SQ 4000, Genomic solutions[®]*) übernahm dann das Zusammenpipettieren von 300 nL Reservoirlösung und 300 nL einer zuvor klarfiltrierten Proteinlösung in insgesamt 3x96 (Bio-one Platten) bzw 2x96 (Innovaplates) Vertiefungen. Üblicherweise wurden neben der ursprünglichen Proteinlösung eine 1:1 Verdünnung sowie eine Proteinlösung mit 5 % Glycerin verwendet. Als Reservoirösungen dienten die kommerziell erhältlichen Screens Nextal Classics Suite, Nextal Classics lite Suite, Nextal Anions Suite (*QIAGEN*) mit je 96 verschiedenen Bedingungen sowie die jeweils 50 Lösungen des Sigma Basic Kits, des Sigma Extension Kits und des Sigma Cryo Kits (*Sigma*), die durch Verdünnung von 46 Lösungen auf 96 Bedingungen erweitert wurden (zur Zusammensetzung der Screenlösungen siehe Anhang 7). Die Versiegelung der Platten erfolgte mittels VIEW-sealTM Klebefolien (*Greiner Bio-one*). Screens im 24well-Format wurden nach der *hanging-drop* Methode durchgeführt. Hierzu wurde der Sigma Basic Kit, sowie eine 1:1 Verdünnung dieses Kits verwendet.

2.6.2 Optimierung

Optimierungen wurden im 24-well Format entweder im *hanging-drop*- oder *sitting drop*-Verfahren durchgeführt. Hierbei wurden hauptsächlich pH-Wert und

Fällungsmittelkonzentration variiert. Bei der *hanging-drop*-Methode wurden 1 μL der klarfiltrierten Proteinprobe mit dem gleichen Volumen Reservoirlösung auf einem 22 mm Deckplättchen (*Hampton Research*) durch Auf- und Abpipettieren vermischt. Das Deckplättchen wurde dann umgekehrt auf das mit 750 μL oder 1 mL Reservoirlösung gefüllte *well* einer mit Siliconfett versehenen VDX-Platte (*Hampton Research*) mit 24 Reservoirs gelegt und vorsichtig festgedrückt. Diese Siliconfettschicht sorgte für ein abgeschlossenes System. Alternativ zu den *Hampton* VDX-Plates wurden *24well crystallization tools* (QIAGEN) mit verschraubbaren Deckeln mit und ohne *drop guard* verwendet, die ein mehrmaliges Öffnen und Schließen des Kristallisationsansatzes ermöglichen. Bei den *drop guards* handelt es sich um Vertiefungen, die das Auftragen von bis zu 6 verschiedenen Tropfen erlauben und das Zusammenlaufen größerer Tropfen verhindern.

Für die Durchführung von Optimierungen nach der *sitting-drop*-Methode wurden 1 μL Proteinlösung mit 1 μL Reservoirlösung in der Vertiefung gemischt. Das mit 750 μL Reservoirlösung gefüllte *well* einer mit Siliconfett versehenen VDX-Platte (*Hampton Research*) wurde dann mit einem 22 mm Deckplättchen (*Hampton Research*) bedeckt, das vorsichtig festgedrückt wurde.

2.6.3 Inkubation, Beobachtung und Dokumentation

96*well*-Kristallisationsplatten wurden in einem Inkubationsschrank bei 18 °C inkubiert, die 24*well*-Platten in einem auf 19 °C klimatisierten Raum. Erste Beobachtungen wurden direkt nach Fertigstellung der Platten gemacht, dann nach 2-3 Tagen und danach in Wochen- bis Monatsabständen. Dazu wurden die 24*well*-Kristallisationsansätze unter einem B601 Mikroskop (*Olympus*) durch einen Polfilter hindurch betrachtet und die erhaltenen Kristalle mit einer Power Shot A70 Digitalkamera (*Canon*) fotografiert. Die Beobachtung und Dokumentation der Kristallisationsansätze in 96*well*-Platten erfolgte entweder mittels des Dokumentationssystems CrystalPro HT 110 (*Tri Tek Corporation*), oder sie wurden analog zu den 24*well*-Platten durch ein Mikroskop betrachtet und erhaltene Kristalle mit einer Digitalkamera fotografiert.

2.6.4 Austesten von Cryobedingungen

Die Datensammlung von Kristallen durch Röntgendiffraktion wird heutzutage nahezu ausschließlich bei einer Temperatur von 100 K durchgeführt. Dies dient dazu, Strahlenschäden während der mitunter mehrere Tage dauernden Datensammlung zu

vermeiden. Dabei darf jedoch die den Kristall umgebende Flüssigkeit keine Eiskristalle ausbilden, da diese durch das Auftreten spezifischer Eisringe das Beugungsmuster des Kristalls erheblich stören würden. Optimalerweise enthält bereits die Kristallisationslösung sogenannte Cryoprotektantien, wie etwa Glycerin oder Polyethylenglykole. Ist dies jedoch nicht der Fall, führt der Zusatz von Glycerin mit einer Endkonzentration von 30-35 % meist zum Erfolg.

Zum Testen einer geeigneten Cryobedingung wurde zunächst die Cryoschleife durch den ausgewählten Cryopuffer hindurchgezogen und dann die Lösung während des Aufsetzens auf den Goniometerkopf direkt im Stickstoffstrom schockgefroren. Geeignete Cryopuffer zeigten nach Aufnahme eines Röntgenbildes an der Kupferdrehanode nicht die typischen Eisringe bei 1.9, 2.5 und 3.66 Å.

Gleichzeitig sollten Cryopuffer jedoch auch die Morphologie des Kristalls nicht beeinflussen. So kann z. B. die Anwesenheit hoher Glycerinkonzentrationen zum Auftreten von Rissen im Kristall oder sogar zum Auflösen des Kristalls führen. Zeigte ein Kristall nach 20 bis 30-sekündiger Inkubation im Cryopuffer unter dem Mikroskop keine sichtbaren Veränderungen, wurde er nach Überführung in eine Cryoschleife entweder direkt im Cryostrom oder durch Eintauchen in flüssigen Stickstoff schockgefroren.

2.6.5 Datensammlung und Datenreduktion

Zur Aufnahme eines Datensatzes wurde der gefrorene Kristall in einer Cryoschleife auf dem Goniometerkopf vor der Röntgenquelle montiert und so justiert, dass der Röntgenstrahl direkt auf den Kristall traf. Im Verlauf der Datensammlung wurde der Kristall während der Belichtungszeit um einen bestimmten Winkel von $\varphi = 0.2-0.5^\circ$ gedreht und so auf einer Kupferdrehanode (*Bruker/Nonius* AXS FR591, 50 kV, 100 mA) mit einer MAR345dtb Bildplatte (*MAR Research*) vermessen.

Alternativ wurden Datensätze auch an den Synchrotronquellen des DESY in Hamburg (Beamline BW7A), des Paul Scherrer-Instituts an der Swiss Light Source in Villigen/Schweiz (Beamline X06SA) und der European Synchrotron Radiation Facility (ESRF) in Grenoble/Frankreich (Beamline ID 14-2 bzw. ID 23-2) aufgenommen.

Anhand der Aufnahme einiger weniger Diffraktionsbilder ließen sich meist bereits die Zellparameter, die Raumgruppe und die zu erwartende Auflösung bestimmen. Nach Indizierung mit dem Programm MOSFLM [137] und nach Abschätzung der Mosaizität lieferte die Option STRATEGY einen für die Aufnahme eines vollständigen Datensatzes

notwendigen Winkelbereich. Die Skalierung der Intensitäten der Einzelbilder und die Datenreduktion wurden mit den Programmen SCALA und TRUNCATE [137] durchgeführt. Bei der Aufnahme von Datensätzen an der ESRF wurde mit der dort installierten Software DNA (<http://www.dna.ac.uk/index.html>) gearbeitet. Die Prozessierung der ESRF-Daten erfolgte mit dem Programm XDS, die Skalierung mit XSCALE [138].

2.6.6 Strukturlösung und Verfeinerung

Zur Lösung des Phasenproblems wurde die Methode des *molecular replacement* (Molekularer Ersatz) unter Verwendung des Programms MOLREP [139] angewandt. Um eine Kristallstruktur mittels *molecular replacement* lösen zu können, ist das Vorhandensein einer Struktur mit hoher Sequenzidentität bzw. -homologie zur zu lösenden Struktur erforderlich, die als Suchmodell dient. Das Prinzip des *molecular replacements* entspricht dann einer sechsdimensionalen Suche des Modells in den Daten der zu lösenden Kristallstruktur. Durch drei Rotations- und drei Translationsparameter kann das bekannte Strukturmodell auf die Position der unbekannten Struktur in der neuen Zelle transformiert werden. Aufgrund des hohen Rechenaufwands bei der Suche nach sechs Parametern führen die meisten *molecular replacement* Programme erst eine Rotationssuche und dann eine Translationssuche durch. Durch Vergleich der Pattersonfunktionen des Suchmodells mit der des zu lösenden Datensatzes erhält man schließlich die Orientierung des Moleküls in der neuen Zelle.

Zur Verfeinerung des aus der Strukturlösung erhaltenen Modells wurde das Programm Refmac 5 [140] verwendet. Hierbei wird in iterativen Schritten versucht, die Übereinstimmung des erstellten Suchmodells mit den gemessenen Daten durch Berücksichtigung stereochemischer Randbedingungen (z. B. Bindungslängen, Torsionwinkel, häufige Rotamere) zu optimieren. Der manuelle Einbau des Modells in die $2F_{\text{obs}}-F_{\text{calc}}$ und die $F_{\text{obs}}-F_{\text{calc}}$ -Elektronendichten erfolgte mit dem Programm Coot [141]. Nach Verfeinerung der Proteinketten und Kofaktoren wurden Wassermoleküle sowie andere Solvensmoleküle in die Elektronendichten eingebaut.

Ein Kriterium für die Übereinstimmung der gemessenen Daten F_{obs} mit dem berechneten Modell F_{calc} ist der kristallographische R-Faktor, der bei einer fertig verfeinerten Struktur kleiner als 20 % sein sollte. Um eine Überinterpretation der Daten zu verhindern, benutzt man außerdem den R_{free} -Wert, der aus einem vor der Verfeinerung abgetrennten Testsatz berechnet wird [142]. Dieser Testsatz, der nicht in die Verfeinerung mit einbezogen wird, beinhaltet etwa 5-10 % der Daten, die bei vorhandener nichtkristallographischer Rotationssymmetrie (NCS) aus einer Auflösungsschale stammen sollten, um eine Korrelation zwischen Daten des

Testsatz und des Arbeitssatz zu verhindern. Denn diese würde zu einer zu geringen Differenz von R_{free} zu R_{work} und damit zu einer zu guten Bewertung der Daten führen. Bei guter Übereinstimmung von Modell und Daten übersteigt der R_{free} -Wert den R-Faktor nur um wenige Prozente.

2.6.7 Graphische Darstellungen

Darstellungen von Proteinstrukturen wurden mit dem Programm Pymol [143] angefertigt. Die Oberfläche der Proteine sowie deren Oberflächenpotentiale wurden mit dem Programm APBS [144] berechnet. Proteinalignments wurden mit Bioedit erstellt [145].

3 Ergebnisse

Das *Thermus thermophilus* Dodecin (Gen ID *TTHA1431*) ist ein dodecameres Protein, dessen Monomere mit 69 Aminosäuren ein Molekulargewicht von 7617 Da aufweisen (siehe auch Anhang 4). Wie bereits gezeigt wurde [146], ist es ein Flavin-bindendes Enzym, das nach heterologer Expression in *E. coli* vor allem den Flavinkofaktor FMN gebunden hat, während für das *H. salinarum* Dodecin die Bindung von Riboflavin beobachtet wurde [94]. Die Kristallstruktur eines nicht-stöchiometrischen Dodecin:FMN Komplexes zeigt im Gegensatz zur bisher bekannten *re-re*-Orientierung der Flavindimere im *H. salinarum* Dodecin eine *si-si*-Anordnung. Daher wurden zur näheren Charakterisierung der FMN-Bindung im *T. thermophilus* Dodecin ausgehend von der Kristallstruktur verschiedene Mutanten erzeugt, bei denen hochkonservierte Reste, die wesentlich an der Bindung des Flavinkofaktors beteiligt sind, mutiert wurden. Dies waren zum einen der R45-Rest zur Untersuchung der Dimerorientierung, der R65-Rest, der an der Bindung der Phosphatgruppe beteiligt ist, der Q57-Rest, der Wasserstoffbrücken zum C2-O und N3-H des Isoalloxazinringes ausbildet sowie der W38-Rest, der mit den Flavindimeren durch π -Stapelwechselwirkung interagiert und daher besonders von spektroskopischem Interesse ist. In dieser Arbeit wurden insgesamt sieben FMN-Mutanten erzeugt (R45A, R65A, Q57A, W38F, W38Y, W38A, W38V, siehe Abb. 15 A), von denen jedoch nur die R45A-, die R65A- sowie die W38F- und die W38Y-Mutante näher charakterisiert wurde (siehe Kapitel 3.1).

Des Weiteren wurde die Flavinbindung des Dodecins mit der Gen-ID *Rv1498a* im Eubakterium *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv charakterisiert. Hierbei handelt es sich um ein 70 AS Protein mit einem Molekulargewicht von 7497 Da.

Ausgehend vom Proteinalignment (siehe Abb. 15 C) wurde die Bindung von FMN-Dimeren in einer *si-si*-Orientierung vorhergesagt. Zur Bestätigung dieser Hypothese wurde daher das homologe Protein aus *M. tuberculosis* erzeugt und sowohl biochemisch als auch strukturell charakterisiert (siehe Kapitel 3.2).

In dieser Arbeit konnte außerdem die Bindung von CoA als zweitem Kofaktor nachgewiesen werden. Zur weiteren Charakterisierung der CoA-Bindung wurden ausgehend von den Informationen, die anhand der Kristallstrukturen gewonnen wurden, Mutanten der an der CoA-Bindung wesentlich beteiligten Aminosäurereste K6, R28 und R34 erzeugt (siehe Kapitel 3.1).

Zur Untersuchung der CoA-Bindung in weiteren Organismen wurden daher zusätzlich zum *M. tuberculosis* Dodecin die Dodecin-Homologen aus *S. coelicolor* und *P. aeruginosa* (Gen IDs *SCM10.03* und *PA0038*) kloniert (siehe Kapitel 3.3 und 3.4). Die nähere Charakterisierung der CoA-Bindung in den Homologen und den erzeugten Mutanten (K6, R28A, R28E, R34A, R34Q) war Thema der Diplomarbeit von Bodo Sander [147].

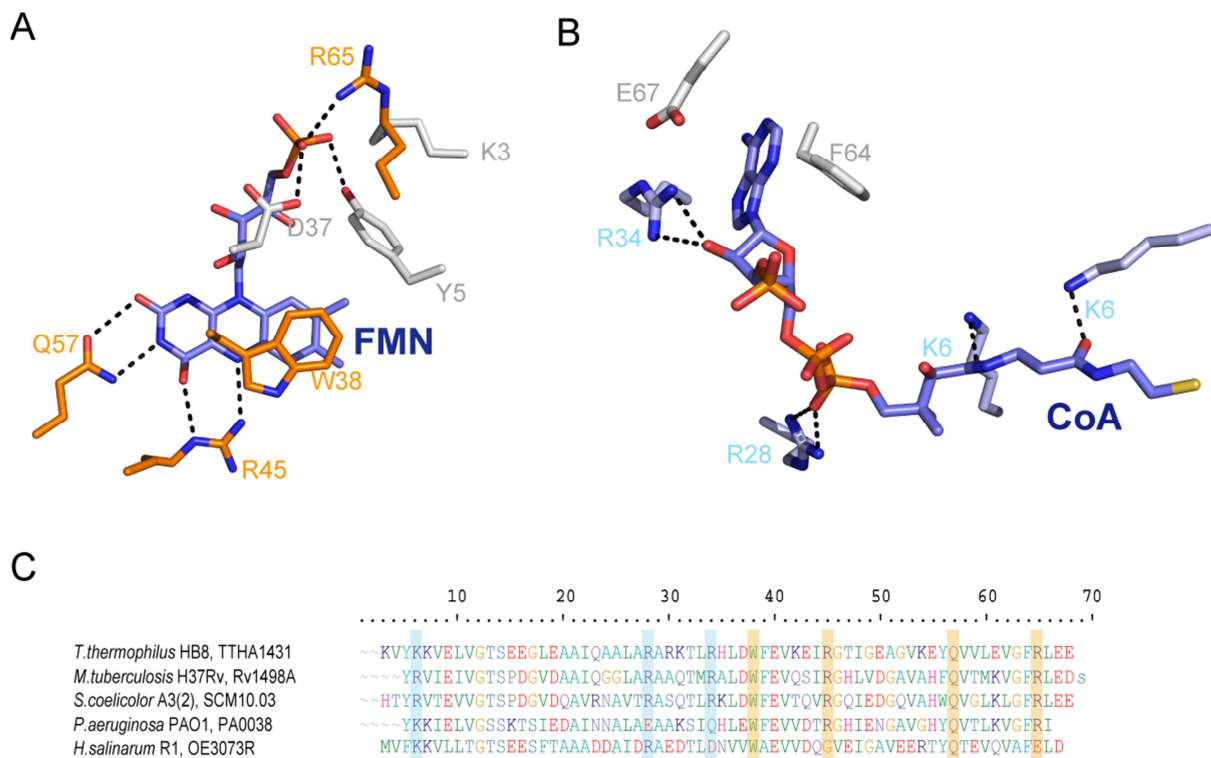


Abb. 15: Positionen der erzeugten Mutanten

A: Positionen und Wechselwirkungen der erzeugten FMN-Mutanten.

B: Positionen und Wechselwirkungen der erzeugten Coenzym A-Mutanten.

Zur besseren Übersicht ist jeweils nur ein Kofaktormolekül mit den jeweiligen Wechselwirkungen gezeigt. Kofaktoren sind in blau dargestellt, ursprüngliche Aminosäurereste in orange, bzw. blau. Zusätzlich sind andere - nicht mutierte - wechselwirkende Aminosäuren in grau gezeigt.

C: Sequenzalignment der Dodecinorthologe aus *T. thermophilus*, *M. tuberculosis*, *S. coelicolor*, *P. aeruginosa* und *H. salinarum*. Angegeben sind außerdem Stammnummer und Genbezeichnung. Mutierte, an der FMN-Bindung beteiligte Aminosäuren sind orange, an der CoA-Bindung beteiligte Aminosäuren blau unterlegt.

Teilabbildungen A und B wurden mit Pymol erstellt, Teilabbildung C mit Bioedit.

Eine Übersicht über die durchgeführten Arbeiten gibt Tab. 5.

Tab. 5: Durchgeführte Arbeiten

	Klonierung	Testexpression	Expression und Aufreinigung	Biochemische Charakterisierung	Spektroskopische Charakterisierung	Untersuchung der FMN-Bindung	Untersuchung der CoA-Bindung	Kristallisation	Funktionelle Charakterisierung
Tthdode	2	2	2	2	1,2	1,3	3	1,2	
Tthdode W38F	1	1	1	1	1			1	
Tthdode W38Y	1	1	1	1	1			1	
Tthdode W38A	1	1							
Tthdode W38V	1	1							
Tthdode R45A	1	1	1	1	1			1	
Tthdode R65A	1	1	1	1	1			1	
Tthdode Q57A	1	1							
Tthdode K6A	1	1							
Tthdode R28A	1	1							
Tthdode R28E	1	1							
Tthdode R34A	1	1							
Tthdode R34Q	1	1							
Mtdode	1,2	1	1,3	1	1	3	3	1	
Scdode	1	1	3	3	3	3	3	3	
Padode	1	1	3	3	3		3	3	1,3

1: diese Arbeit

2: [146]

3: [147]

In dieser Tabelle und der weiteren Arbeit werden folgende Abkürzungen verwendet:

Tthdode für das *T. thermophilus* Dodecin; Mtdode für das *M. tuberculosis* Dodecin; Scdode für das *S. coelicolor* Dodecin, Padode für das *P. aeruginosa* Dodecin.

3.1 Charakterisierung des Dodecins aus *T. thermophilus*

3.1.1 Klonierung des *T. thermophilus* Dodecingens und seiner Mutanten

3.1.1.1 Klonierung des Gens für das *T. thermophilus* Dodecin und seiner Mutanten

Das für das *Thermus thermophilus* Dodecin codierende Gen wurde bereits während der Diplomarbeit [146] über die Schnittstellen NcoI und XhoI in den pET28a-Vektor kloniert und lieferte das Plasmid tthdode-pET28.

Die *T. thermophilus*-Dodecin-Mutanten lassen sich in zwei Gruppen einteilen: Während die Mutanten W38Y, W38F, W38A, W38V, R45A, R65A, Q57A der Untersuchung der FMN-Bindung dienen sollten, wurden die Mutanten K6A, R28E, R28A, R34Q und R34A zur Analyse der CoA-Bindung erzeugt.

Alle *T. thermophilus* Dodecin-Mutanten wurden durch ortsspezifische Mutagenese unter Verwendung des QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kits (*Stratagene*) konstruiert. Als Templat für die PCR mit der Pfu-Turbo DNA-Polymerase diente das Plasmid tthdode-pET28, zur Sequenz der verwendeten Primer siehe Anhang 5. Da bei der R45A- und der R34Q-Mutante eine analytische Schnittstelle eingeführt werden konnte (KpnI bzw. PstI), wurde bei diesen Mutanten der Erfolg der Mutagenese zunächst durch einen analytischen Restriktionsverdau überprüft. Von den übrigen Mutanten wurden jeweils drei Klone mit Hilfe der Sequenzierungsprimer pET.up und pET-T7-Term (*inhouse*) bzw. T7 und pET-RP (Fa. GATC) und doppelsträngiger Sequenzierung mittels der Didesoxymethode auf Vorhandensein der gewünschten Mutation und Fehlerlosigkeit der übrigen Sequenz überprüft. Die Kontrolle der erhaltenen Sequenzen ergab, dass von drei Klonen jeweils mindestens einer die gewünschte Sequenz besaß.

3.1.2 Expression und Aufreinigung

Nach Testexpression aller erzeugten Mutanten wurden präparativ in dieser Arbeit nur die Mutanten W38F, W38Y, R45A und R65A exprimiert, aufgereinigt und charakterisiert.

3.1.2.1 Expression der *T. thermophilus* Dodecin Mutanten

Um zu untersuchen, ob die Dodecin-Mutanten unter den gleichen wie für das *T. thermophilus* Wildtyp Dodecin ermittelten Bedingungen hinreichend Protein für die Strukturanalyse und

andere biophysikalische Methoden exprimierten, wurden zunächst Testexpressionen im Expressionswirt BL21-Gold(DE3) durchgeführt.

Die Testexpressionen erfolgten durch Autoinduktion in LB-Medium bei 37 °C und 225 rpm im 50 mL-Maßstab und wurden mit allen Mutanten durchgeführt. Alle 2 h wurde das Wachstum der Zellen durch Messen der OD bei 595 nm verfolgt und Gelproben für die anschließende SDS-PAGE entnommen. Auf diese Weise konnte gezeigt werden, dass alle Mutanten in ausreichendem Maße gebildet wurden.

Aufgrund der Ergebnisse der Testexpressionen wurden präparative Expressionen der *Thermus thermophilus* Dodecin Mutanten analog zum Wildtyp Dodecin bei 37 °C und 150 rpm durch Autoinduktion im 5 L-Erlenmeyerkolben mit einem Kulturvolumen von 2 L durchgeführt. Nach 18-24 h wurden die Zellen innerhalb der stationären Phase bei einer erreichten OD₅₉₅ von 4.5-6.0 geerntet, in AM-Puffer resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert. Abb. 16 A zeigt exemplarisch ein SDS-PAGE-Gel der präparativen Expression der R65A-Mutante.

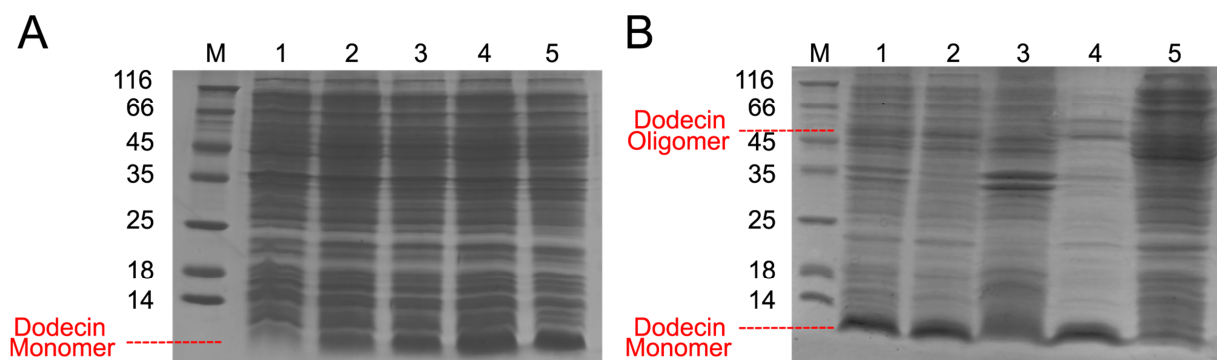


Abb. 16: 15 % SDS-PAGE-Gele von Expression, Aufschluss und Hitzefällung der R65A-Mutante vom *T. thermophilus* Dodecin

A: Expression der R65A-Mutante in LB-Medium durch Autoinduktion. Bahn 1: Übernachtskultur von BL21-Gold(DE3)/Tthdode-R65A-pET28; Bahn 2: 2 h nach Animpfen; Bahn 3: 4 h nach Animpfen, Bahn 4: 6 h nach Animpfen; Bahn 5: 8 h nach Animpfen; Bahn 6: 24 h nach Animpfen, OD₅₉₅=5.0.
B: Aufschluss und Hitzefällung. Bahn 1: Übernachtskultur; Bahn 2: Überstand nach Aufschluss, Bahn 3: Pellet nach Aufschluss; Bahn 4: Überstand nach Hitzefällung, Bahn 5: Pellet nach Hitzefällung.

3.1.2.2 Aufreinigung der *T. thermophilus* Dodecin Mutanten

Zur Überprüfung von Löslichkeit und Thermostabilität der *T. thermophilus* Dodecin Mutanten wurde ein Testaufschluss durch Ultraschall nach Inkubation mit Lysozym, gefolgt von einer Hitzefällung des löslichen Überstandes (10 min, 65 °C), durchgeführt. Diese sollte dazu dienen, hitzelabile *E. coli* Proteine abzutrennen. Die Analyse durch SDS-PAGE zeigte, dass

in allen Fällen lösliches Dodecin gebildet wurde, das auch nach Inkubation bei 65 °C nicht zur Bildung unlöslicher Aggregate führte, eine Vielzahl kontaminierender *E. coli* Proteine jedoch auf diese Weise effizient abgetrennt werden konnte.

Im präparativen Maßstab wurden nach Lyse der Zellen mittels French Press oder Homogenizer eine Hitzefällung für 10 min bei 65 °C durchgeführt, nach der sich das gewünschte Protein im Überstand befand (siehe Abb. 16 und Abb. 17 Bahn 3). Die Gesamtproteinmenge nach der Hitzefällung betrug etwa 100 mg pro Liter Kulturmedium. Nach Entsalzung durch Dialyse oder Verdünnen mit salzlosem Puffer erfolgte als nächster Aufreinigungsschritt – analog Aufreinigung des Wildtyp Dodecins – eine Anionenaustauscherchromatographie mit Q-Sepharose *high performance* als Säulenmaterial. Anhand des Chromatogramms konnte gezeigt werden, dass die Elution der Dodecine bei etwa 200-400 mM NaCl erfolgte. Die orange (R45A, R65A) bzw. gelb (W38F, W38Y) gefärbten Fraktionen wurden per SDS-PAGE analysiert und die reinsten Fraktionen vereinigt. Eine SDS-PAGE-Gelprobe des R65A-Pools ist in Abb. 17 Bahn 4 zu sehen. Nach der Anionenaustauscherchromatographie betrug die Gesamtproteinmenge etwa 40 mg pro Liter Kultur mit einem Protein:Kofaktorverhältnis von 10:1-18:1.

Zur Abtrennung letzter verunreinigender Proteine wurde nach Aufkonzentrierung der Proteinlösung die Gelfiltration gewählt. Wie schon beim Wildtyp Dodecin beobachtet, wiesen auch die Mutanten eine Heterogenität der Probe auf. Neben einem farbigen Hauptpeak, dessen Elutionsvolumen dem apparenten Molekulargewicht eines Dodecamers entsprach, wurde regelmäßig ein farbloser kleiner Nebenpeak eluiert, dessen Elutionsvolumen dem eines Hexamers entsprach. Haupt- und Nebenpeak mit entsprechenden Elutionsvolumina sind in Abb. 18 gezeigt. Sollte diese heterogene Probe mit endogen gebundenem Kofaktor näher charakterisiert werden, wurden die Fraktionen beider Peaks nach Analyse durch SDS-PAGE vereinigt, aufkonzentriert und bei -20 °C weggefroren (siehe Abb. 17 Bahn 5). Typische Ausbeuten waren hier etwa 10 mg pro Liter Kultur mit einem Protein:Kofaktorverhältnis von 4:1 bis 10:1.

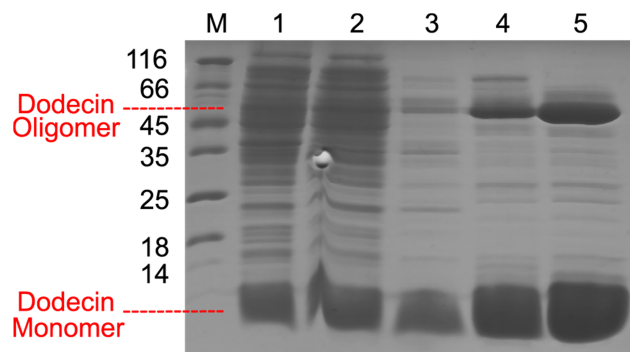


Abb. 17: 15 %-SDS-PAGE-Gel der Aufreinigung der R65A-Mutante

Bahn 1: Übernachtskultur von BL21-Gold(DE3)TthdodeR6A-pET-28 nach 24 h, Bahn 2: Überstand nach Aufschluss mit Homogenizer, Bahn 3: Überstand nach Hitzefällung (10 min, 65 °C), Bahn 4: Probe nach Anionenaustauscherchromatographie, Bahn 5: Probe nach Gelfiltrationschromatographie (hier: 40 µg Protein aufgetragen).

War hohe Homogenität der Probe erforderlich, wurde das Protein nach der Anionenaustauscherchromatographie mit FMN rekonstituiert und überschüssiger Kofaktor durch Gelfiltration mit Superdex 200 als Säulenmaterial abgetrennt. Wie beim Wildtyp Dodecin war nun das Verschwinden des Nebenpeaks zu beobachten (siehe auch Abb. 18 B), außerdem tauchte ein niedermolekularer Peak auf, der überschüssigem Flavinkofaktor entsprach. Eine Ausnahme bildete hier die R45A-Mutante: Auch nach Rekonstituierung mit FMN im Überschuss konnte hier noch der Nebenpeak mit etwa gleicher Intensität wie ohne Rekonstituierung beachtet werden, was einen ersten Hinweis auf eine schwächere FMN-Bindung ergab (siehe Abb. 18 C).

Nach der Gelfiltration wurden die Fraktionen, die nach SDS-PAGE-Analyse das gewünschte Protein in zufriedenstellender Reinheit enthielten, vereinigt, aufkonzentriert und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Üblicherweise betrug nach Rekonstituierung das Protein:Kofaktorverhältnis im Rahmen der Messgenauigkeit etwa 1.2:1 für die W38F-, W38Y- und R65A-Mutante, so dass hier von einer 1:1 Stöchiometrie ausgegangen werden kann und 1.5:1 für die schwächer bindende R45A-Mutante.

3.1.2.3 Rückfaltung des *T. thermophilus* Wildtyp Dodecins

Zur Präparation großer Mengen apo-Dodecin wurde das Protein nach der Anionenaustauscher-Chromatographie durch TCA-Fällung deflaviniert, in Guanidiniumchlorid-haltigen Puffer aufgenommen und dann stufenweise gegen Puffer dialysiert. Hierbei wurden Ausbeuten von etwa 30 % mit einem Flavingehalt < 2 % erhalten.

Aggregiertes Protein sowie andere Verunreinigungen wurden abschließend durch Gelfiltration entfernt. Das Gelfiltrationschromatogramm des apo-Dodecins zeigte einen Hauptpeak bei einem Elutionsvolumen, das dem eines Hexamers entsprach (siehe Abb. 18 A). In Abwesenheit des Flavinkofaktors lag demnach kaum dodecameres Dodecin vor. Durch Rekonstituierung des zurückgefalteten apo-Dodecins mit einem doppelten molaren FMN-Überschuss wurde neben dem niedermolekularen Peak, der dem freien Kofaktor entsprach, wieder ausschließlich der dodecamere Komplex erhalten (siehe Abb. 18 B). Durch Deflavinierung findet demnach keine Schädigung der an der FMN-Bindung beteiligten Aminosäuren statt.

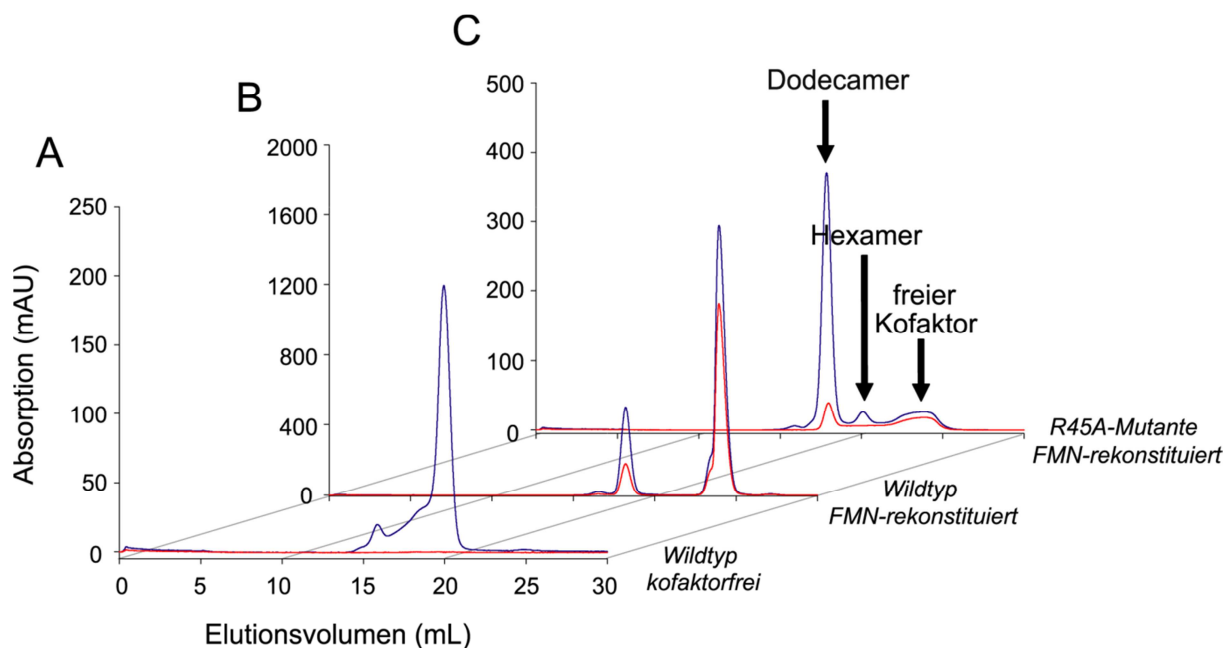


Abb. 18: Gelfiltrationschromatogramme des *T. thermophilus* Dodecins

Die roten Kurven entsprechen der Absorption bei 450 nm, die blauen Kurven der Absorption bei 280 nm. Aufgetragen wurden jeweils 0.5 mL einer Konzentration von 1.5 mg/mL. Man beachte die unterschiedlichen Skalen der Ordinaten.

A: Chromatogramm des zurückgefalteten kofaktorfreien Dodecins. Der Hauptpeak bei einem Elutionsvolumen von etwa 19.9 mL entspricht einem apparenten Molekulargewicht von 46 kDa und somit einem möglichen Hexamer. B: Chromatogramm des zurückgefalteten Dodecins, rekonstituiert mit einem doppelten FMN-Überschuss. Der Peak mit einem Elutionsvolumen von 18.2 entspricht mit einem apparenten Molekulargewicht von 104 kDa dem Dodecamerkomplex, der Peak nach 24 mL dem überschüssigen freien FMN. C: Chromatogramm der FMN-rekonstituierten R45A-Mutante. Peaks werden bei 17.9, 20.0 und 23.5 mL eluiert und entsprechen dem Dodecamer, dem Hexamer und freiem FMN.

3.1.2.4 Präparation von Riboflavin- und FAD-haltigem *T. thermophilus* Dodecin

Zur Präparation von Riboflavin- oder FAD-haltigem Wildtyp Dodecin wurde zurückgefaltetes Dodecin mit einem zweifachen molaren Überschuss des jeweiligen Flavins inkubiert und dann mögliche Verunreinigungen sowie überschüssiges Flavin durch Gelfiltration abgetrennt. Wie bei der Rekonstituierung mit FMN wurde der Dodecamerpeak sowie ein niedermolekularer, dem Flavinkofaktor entsprechender Peak erhalten. Nach Bestimmung der Extinktionskoeffizienten für Dodecin-gebundenes FAD (für den Extinktionskoeffizienten von Riboflavin wurde angenommen, dass er dem von FMN entspricht) konnten auch für das FAD- und das Riboflavin- rekonstituierte *T. thermophilus* Dodecin Protein:Kofaktorverhältnisse von 1.2:1 erhalten werden, womit alle drei Flavinkofaktoren in ähnlichen stöchiometrischen Verhältnissen binden.

3.1.2.5 Bestimmung des Molekulargewichtes durch Massenspektrometrie

Das Molekulargewicht der aufgereinigten Dodecinmonomere wurde mittels HPLC-ESI-MS ermittelt. Die erhaltenen Messwerte finden sich in Tab. 6.

Tab. 6: Vergleich ermittelter und berechneter Molekulargewichte der *T. thermophilus* Dodecine

	Experimentell ermittelt	berechnet (+f-Met)	berechnet (-f-Met)
<i>T. th</i> Dodecin WT	7615.7	7775.9	7617.6
<i>T. th</i> Dodecin W38Y	7592.9	7725.9	7594.7
<i>T. th</i> Dodecin W38F	7576.6	7709.9	7578.7
<i>T. th</i> Dodecin R45A	7531.2	7663.8	7532.6
<i>T. th</i> Dodecin R65A	7530.7	7663.8	7532.6

Angegeben sind jeweils die M+1-Werte des Molekulargewichtes

Durch Bestimmung der Molekulargewichte der aufgereinigten Proteinproben konnten die erwarteten Molekulargewichte bestätigt werden. Hierdurch konnten Mutationen innerhalb der Polypeptidkette ausgeschlossen werden. Außerdem zeigten die ermittelten Molekulargewichte eine posttranslationale Abspaltung von N-terminalem N-Formyl-Methionin. Die Abweichungen von zwei Dalton zwischen berechneten und gemessenen Massen sind vermutlich auf Ungenauigkeiten bei der Kalibrierung zurückzuführen, da Messungen die

später von auf denselben Konstrukten beruhenden Proteinen durchgeführt wurden, Werte innerhalb der Spezifikation ergaben [148].

3.1.3 Kofaktorbindung und Oligomerisierung von Dodecinen

3.1.3.1 Qualitative Bestimmung der Kofaktoren durch Massenspektrometrie

Zur Identifizierung der in der R65A-Mutante endogen gebundenen Flavinkofaktoren wurden diese durch TCA-Fällung aus der Proteinlösung extrahiert und mittels HPLC-ESI-MS analysiert. Da davon ausgegangen wurde, dass sich die W38Y, W38F und R45A-Mutante in der Art der gebundenen Flavinkofaktoren nicht vom Wildtyp unterscheiden, wurde nur die R65A-Mutante massenspektrometrisch untersucht. Zunächst wurden als Kofaktoren – in Analogie zum Wildtyp – nur FMN und Riboflavin detektiert, als jedoch in der Kristallstruktur auch Elektronendichte für Coenzym A gefunden wurde, konnte dieses ebenfalls massenspektrometrisch nachgewiesen werden. Hierbei konnte gezeigt werden, dass CoA nach Extraktion aus dem Protein in der oxidierten dimeren Form vorliegt.

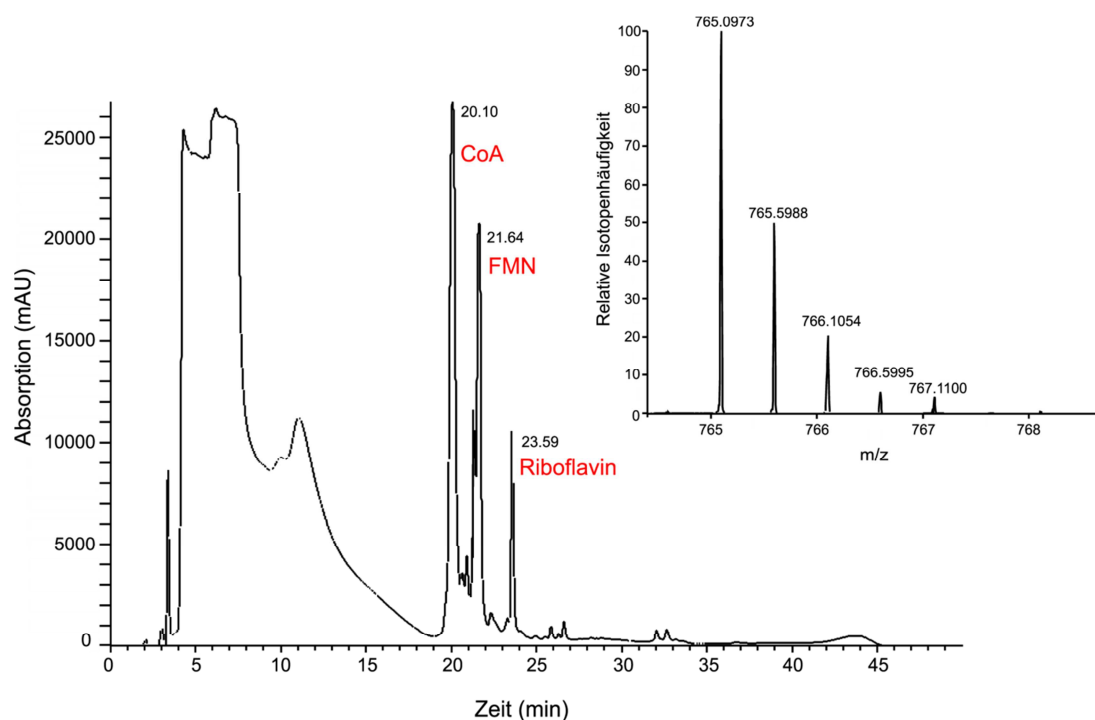


Abb. 19: Identifizierung Dodecin-gebundener Kofaktoren mittels Massenspektrometrie

HPLC-Chromatogramm des TCA-Extraktes der R65A-Mutante mit endogen gebundenen Kofaktoren. Verwendet wurde eine Nucleodur 2 mm x 125 mm C18 Gravity Flow Säule (*Macherey & Nagel*) mit einer Partikelgröße von 3 μ M. Die Elution erfolgte mit einem Wasser/Methanol-Gradienten bei einer Flussrate von 0.2 mL/min. Detektiert wurde die Absorption bei 215 nm. Die Peaks bei 20.10, 21.84 und 23.59 min wurden mittels ESI-MS untersucht und ergaben die Molekulargewichte 765, 455 und 375, was den molaren Massen der Kofaktoren CoA, FMN und Riboflavin entspricht.

3.1.3.2 Quantitative Bestimmung von CoA mittels des Ellman Assays

Nach dem qualitativen Nachweis der CoA-Bindung in der R65A-Mutante durch Strukturbestimmung und Massenspektrometrie wurde ein Ellman-Assay unter denaturierenden Bedingungen zur Analyse des gebundenen CoA-Anteils durchgeführt. Dieser lieferte ein Dodecin:CoA-Verhältnis von 2:1 für die nicht-rekonstituierte und 10:1 für die FMN-rekonstituierte R65A-Mutante des *T. thermophilus* Dodecins.

3.1.3.3 Bestimmung Protein-gebundener Flavin-Extinktionskoeffizienten

Flavin-Extinktionskoeffizienten wurden spektroskopisch nach Freisetzung der Protein-gebundenen Flavine durch TCA-Fällung ermittelt. Durch Bestimmung der modifizierten Extinktionskoeffizienten $\epsilon_{\text{FMN, mod}}=10400 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ und $\epsilon_{\text{FAD, mod}}=10000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ wurden unter Zuhilfenahme der Literaturwerte $\epsilon_{448,\text{FMN}}=12600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ und $\epsilon_{450,\text{FAD}}=11300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [123] folgende molare Extinktionskoeffizienten berechnet:

Tab. 7: Extinktionskoeffizienten Dodecin-gebundener Flavine

Protein	FMN	FAD
<i>T. thermophilus</i> Dodecin Wildtyp	9500 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$	9000 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$
<i>T. thermophilus</i> Dodecin W38Y	7900 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$	n.b.
<i>T. thermophilus</i> Dodecin W38F	8750 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$	n.b.

n. b. = nicht bestimmt

Anhand der Absorptionsspektren ist der Einfluss von TCA auf das Spektrum sowohl freier als auch Protein-gebundener Flavine deutlich sichtbar (hier nicht gezeigt): In beiden Fällen führt TCA zu einer Abnahme der Absorption um 450 nm und somit zu einer deutlichen Veränderung des Absorptionsspektrums. Im Falle der Dodecin-enthaltenden Proben ist außerdem das erwartete Verschwinden der Schulter bei 490 nm zu beobachten, so dass man von einer vollständigen Denaturierung und somit auch einer quantitativen Freisetzung des Kofaktors ausgehen kann.

3.1.3.4 CD-Spektroskopie

CD-Spektren wurden vom FMN-rekonstituierten *T. thermophilus* Wildtyp Dodecin, dem zurückgefalteten apo-Dodecin sowie der FMN-rekonstituierten R45A-Mutante aufgenommen.

Hierbei war von Interesse, welchen Einfluss die Kofaktorbindung und damit der Oligomerisierungszustand auf die Thermostabilität des Dodecins besitzt. Dazu wurden CD-Spektren im fernen UV-Bereich sowie Schmelzkurven an den Elliptizitätsmaxima aufgenommen.

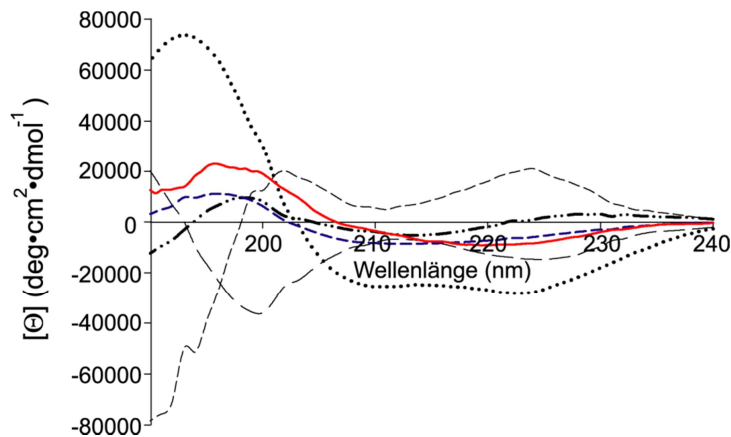


Abb. 20: CD-Spektren verschiedener Sekundärstrukturen

Gezeigt sind hier die CD-Spektren einer α -Helix (gepunktet), eines β -Faltblatts (gestrichelt und gepunktet), eines β -turns (gestrichelt) und einer ungeordneten (*random*) Struktur (lang gestrichelt). In rot dargestellt ist das gemessene CD-Spektrum des apo-Dodecins, in blau gestrichelt ein berechnetes Spektrum aus 51 % β -Faltblatt und 22 % α -Helix, 16 % ungeordneter Struktur sowie 18 % β -turns.

Die CD-Spektren bei Raumtemperatur zeigen ein Spektrum eines im Wesentlichen aus β -Faltblättern und α -Helices bestehenden Proteins (siehe Abb. 20), das sich bei Erhöhung der Temperatur auf 95 °C nicht merklich ändert (siehe Abb. 21). Eine schwächere FMN-Bindung, wie sie für die R45A-Mutante vermutet wird, bzw. die Abwesenheit aller Kofaktoren scheint demnach keinen Einfluss auf die Stabilität der Sekundärstruktur zu haben. Schmelzkurven (hier nicht gezeigt) von 20-95 °C, die an den Elliptizitätsmaxima 198 und 222 nm aufgenommen wurden, zeigen keinen sigmoidalen Verlauf, so dass ein kooperatives Aufschmelzen der Sekundärstruktur auch hier nicht beobachtet werden kann.

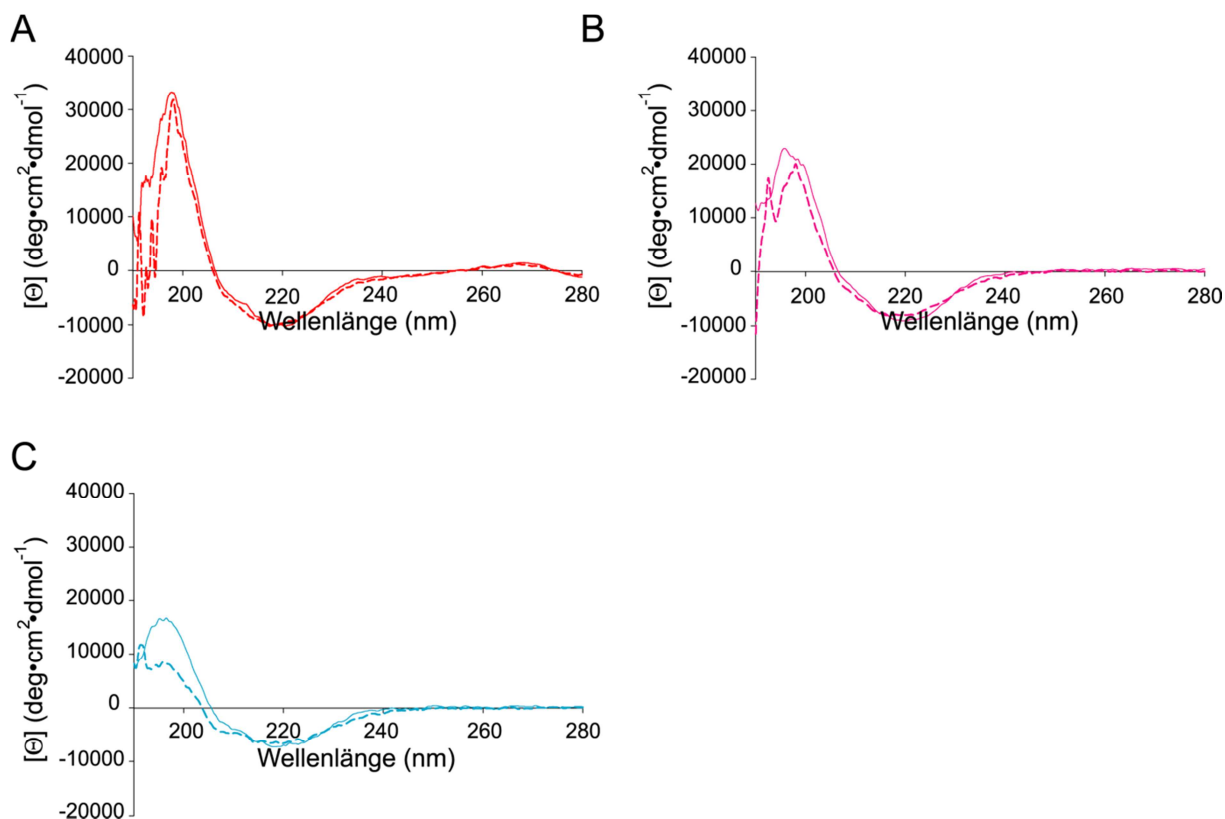


Abb. 21: CD-Spektren des *T. thermophilus* Dodecins

Gezeigt sind hier die CD-Spektren des FMN-rekonstituierten WT Dodecins (A), des apo-Dodecins (B) sowie der R45A-Mutante (C) bei 20 °C (durchgezogene Linie) und bei 95 °C (gestrichelte Linie) von 190-280 nm in 10 mM Tris/HCl, pH 8.0.

Zur näheren Untersuchung der Dodecin-FMN-Wechselwirkung wurden UV-VIS CD-Spektren von Dodecin:FMN-Komplexen verschiedener Stöchiometrie aufgenommen und mit den Spektren von apo-Dodecin sowie freier FMN-Lösung verglichen (s. Abb. 22). Zu beobachten ist, dass das Spektrum der freien FMN-Lösung nur eine geringe negative Elliptizität bei etwa 270 nm aufweist und auch die apo-Dodecin-Lösung nur ein geringes Maximum bei etwa 270 nm besitzt, das durch die Absorption der aromatischen Aminosäuren – hier vermutlich vor allem durch die Tryptophanreste – hervorgerufen wird. Die Spektren der Dodecin:FMN-Komplexe zeigen neben dem deutlich positiverem Maximum bei 268 nm, dessen erhöhte Elliptizität für *stacking*-Interaktionen typisch ist [149], weitere Extrema bei 282, 354, 392 und 509 nm, deren Intensität mit zunehmendem FMN-Gehalt zunimmt, so dass die höchste Elliptizität in einem 1:1-Komplex erreicht wird. Da diese Spektren nicht durch die Addition der Spektren der freien FMN-Lösung und der apo-Dodecinlösung erhalten werden können, wird hier ein deutlicher Hinweis auf die Interaktion von Dodecin und FMN gegeben.

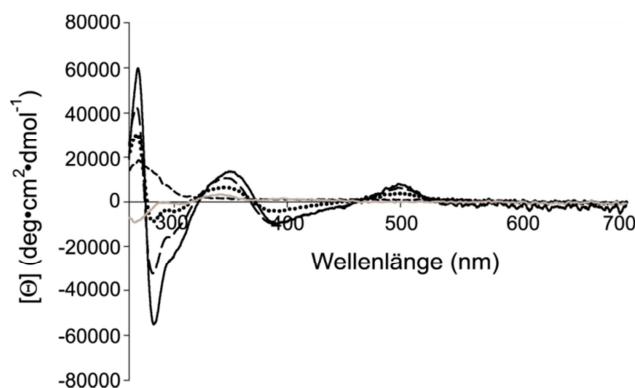


Abb. 22: UV-VIS CD-Spektren des *T. thermophilus* Dodecins

Die Abbildung zeigt die molare Elliptizität eines stöchiometrischen Dodecin:FMN-Komplexes (schwarze Linie), eines Dodecin:FMN-Komplexes im Verhältnis 3:2 (schwarze lang gestrichelte Linie), eines Dodecin:FMN-Komplexes im Verhältnis 3:1 (schwarze gepunktete Linie), des apo-Dodecins (schwarze kurz gestrichelte Linie) sowie einer FMN-Lösung (graue Linie) im UV-VIS-Bereich von 260-700 nm.

Die Abnahme der Elliptizität mit Freisetzung des Kofaktors ist auch in Abb. 21 zu sehen: Während das FMN-rekonstituierte WT *T. thermophilus* Dodecin ein Maximum bei etwa 270 nm aufweist, ist dieses bei dem apo-Dodecin (aufgrund der geringen Proteinkonzentration) schon nicht mehr erkennbar. Doch auch im Spektrum der R45A-Mutante ist dieses Maximum nicht mehr nachzuweisen, was auf die geringere FMN-Bindungsstärke der R45A-Mutante hinweisen könnte.

3.1.4 Spektroskopische Charakterisierung des Dodecin-Flavin-Komplexes

3.1.4.1 Absorptionsspektroskopie

Die Absorptionsspektren aller Dodecinproben zeigen das für oxidierte Flavine typische Absorptionsspektrum mit Maxima bei etwa 450 und 380 nm, die den $S_0 \rightarrow S_1$ - und $S_0 \rightarrow S_2$ -Übergängen entsprechen. Die Lage und Höhe dieser Maxima weichen jedoch von der des freien Flavins ab und auch zwischen den einzelnen Mutanten treten geringfügige Unterschiede auf (Abb. 23 A). Während der $S_0 \rightarrow S_1$ -Übergang bei freiem FMN bei 445 nm liegt, ist er bei den Dodecinen typischerweise bathochrom verschoben (WT 451 nm, W38Y-Mutante 444 nm, W38F-Mutante 455 nm), die Absorptionsbande des $S_0 \rightarrow S_2$ -Übergangs ist von 373 nm auf 374 nm (WT), 379 nm (W38Y-Mutante) bzw. 383 nm (W38F-Mutante) verschoben. Charakteristisch für Dodecine ist außerdem eine Schulter im Bereich von 480-490 nm, die sich bei allen Dodecinproben beobachten lässt und einem vibronischen Übergang

entspricht (Michel-Beyerle, *manuscript in preparation*). Außerdem fällt beim Vergleich des Absorptionsspektrums des freien FMNs mit dem *T. thermophilus* Dodecin und seinen Mutanten auf, dass nur das WT-Dodecin eine langwellige Absorption im Bereich von 520-600 nm besitzt.

Diese Dodecincharakteristika sind dagegen kaum bei der R45A-Mutante zu erkennen (Abb. 23 B). Da bei dieser Mutante die FMN-Bindung schwächer zu sein scheint, enthalten alle Proben üblicherweise einen nicht vernachlässigbaren Anteil von freiem FMN, so dass es sich bei diesem Spektrum um ein Mischspektrum aus Dodecin und freiem Flavin handelt. So sind Lage und Höhe der Absorptionsmaxima fast unverändert im Vergleich zu freiem FMN, die Dodecinschulter um 480 nm nahezu verschwunden. Allein der *red tail* bei 520-600 nm weist noch auf den Dodecinkomplex hin.

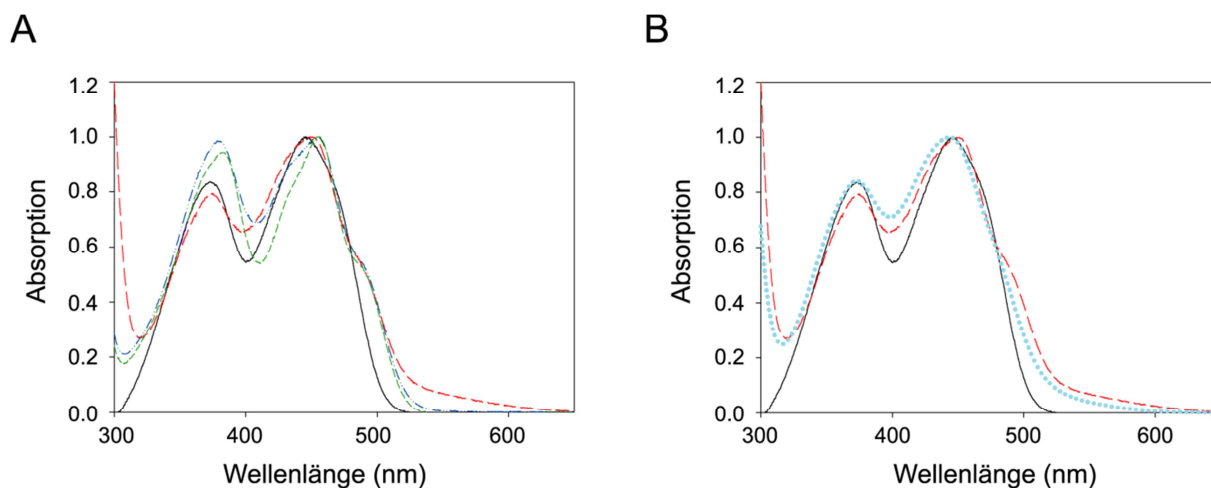


Abb. 23: Absorptionsspektren des *T. thermophilus* Dodecins

A: Absorptionsspektren der W38Y- (blau gepunktete und gestrichelte Linie) und W38F-Mutante (grün gestrichelte Linie) im Vergleich zum Wildtyp (rote lang gestrichelte Linie) und freiem FMN (schwarze Linie). B: Absorptionsspektrum der R45A-Mutante (cyan gepunktete Linie) im Vergleich zum Wildtyp (rote lang gestrichelte Linie) und zu freiem FMN (schwarze Linie). Zum besseren Vergleich wurden die Maxima des $S_0 \rightarrow S_1$ -Übergangs der einzelnen Spektren auf eine OD von 1 normiert.

3.1.4.2 Fluoreszenzemissionsspektren

Die Fluoreszenz des Dodecin-gebundenen Kofaktors FMN sowohl im FMN-rekonstituieren *T. thermophilus* Wildtyp Protein als auch in den W38Y- und W38F-Mutanten wurde mittels Fluoreszenzemissionsspektroskopie untersucht. Die zum Vergleich herangezogene FMN-Lösung zeigte eine intensive Emission bei 529 nm nach Anregung bei 450 nm. Dieses Emissionsmaximum war bei den Dodecinproben um 1-2 nm zu höheren Wellenlängen verschoben. Auch zeigten alle untersuchten Proteinproben eine deutlich geringere Emission

als die freie FMN-Lösung. Der größte Fluoreszenzquench ließ sich beim Wildtyp Dodecin beobachten (1-2 % Restfluoreszenz); jedoch wies auch die W38Y-Mutante einen Fluoreszenzquench von etwa 80 % auf, die Restfluoreszenz der W38F-Mutante betrug noch etwa 30 %.

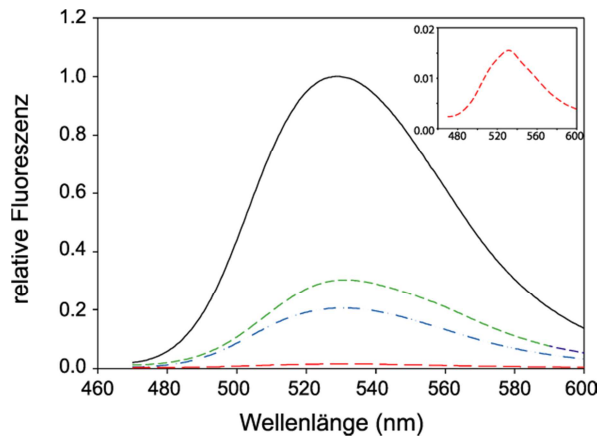


Abb. 24: Fluoreszenzmissionsspektren des *T. thermophilus* Dodecins

Abgebildet ist hier die relative Fluoreszenz des Wildtyp Dodecins (rote lang gestrichelte Linie), der W38Y-Mutante (blau gepunktete und gestrichelte Linie) und der W38F-Mutante (grüne kurz gestrichelte Linie) im Vergleich zu einer FMN-Lösung (schwarze Linie). Die Anregungswellenlänge betrug 450 nm, gemessen wurde die Emission über den Wellenlängenbereich von 470 bis 600 nm. Die Kofaktorkonzentrationen betrugen in alle Fällen 5 μ M. Gezeigt ist außerdem eine Vergrößerung des unteren Intensitätsbereichs des Wildtyp Dodecins. Im Vergleich zu freiem FMN betrug die Restfluoreszenz des Wildtyp Dodecins noch etwa 1.5 % (W38Y: 20.6 %, W38F: 30.3 %).

3.1.5 Spezifität und Zeitabhängigkeit der Bindung von Flavinen an das *T. thermophilus* Dodecin

3.1.5.1 Bestimmung der Dissoziationskonstanten durch Fluoreszenztitration

Zur Bestimmung der apparenten Dissoziationskonstanten K_D bei der Bindung von Flavinen an das *T. thermophilus* Dodecin wurde die Methode der Fluoreszenztitration verwendet. Hierbei wird der starke Fluoreszenzquench ausgenutzt wurde, der bei Bindung des Kofaktors an das Dodecin auftritt.

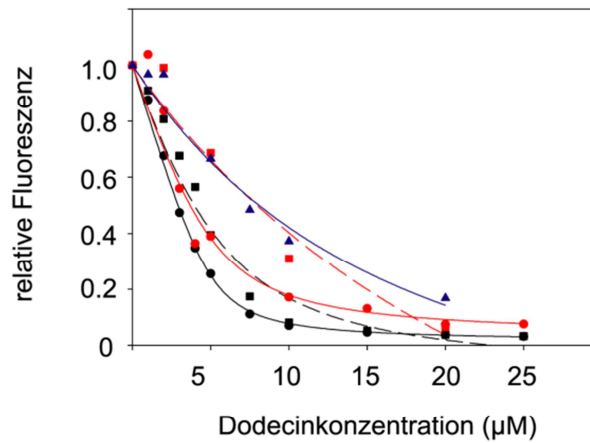
Erste Titrationsexperimente wurden durchgeführt, indem verschiedene Dodecin:Flavin-Lösungen im Verhältnis von 0.2:1 bis 4:1 zusammenpipettiert, inkubiert und schließlich die Fluoreszenzemission gemessen wurde. Hierfür wurden kleine Mengen an apo-Dodecin durch Entfaltung/Rückfaltung durch Dialyse jeweils frisch präpariert. Diese Methode lieferte Bindungskurven, die sich nach einem 1:1 Bindungsmodell fitten ließen; jedoch wiesen die

unterschiedlichen Messungen hohe Abweichungen voneinander auf, wurden hier doch Dissoziationskonstanten von $3.8 \cdot 10^{-7}$ M bis $1.1 \cdot 10^{-5}$ M ermittelt (siehe Abb. 25 A).

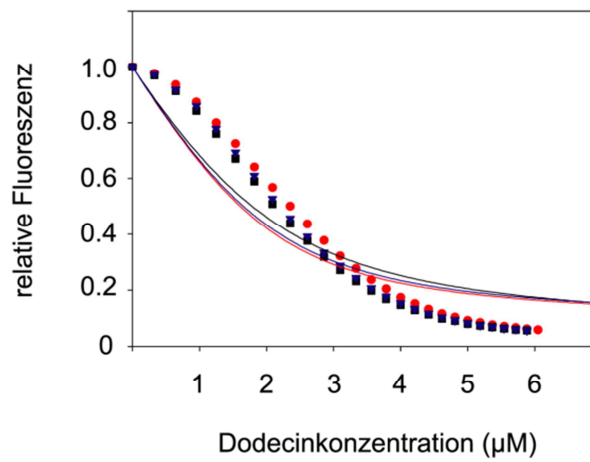
In einem zweiten Experiment wurde eine FMN-Lösung direkt in der Küvette unter Rühren mit kleinen Portionen einer apo-Dodecin-Lösung versetzt und die Fluoreszenz nach 5 Minuten gemessen. Hierfür wurde apo-Dodecin verwendet, das durch TCA-Fällung deflaviniert und dann zurückgefaltet wurde. Diese Methode lieferte reproduzierbare Messwerte, wies jedoch einen sigmoidalen Verlauf der Dissoziationskurve auf, die sich nicht nach einem 1:1 Bindungsmodell fitten ließ (Abb. 25 B). Für diesen sigmoidalen Kurvenverlauf konnte ein zeitabhängiger Effekt der FMN-Bindung verantwortlich gemacht werden; denn Messungen, bei denen nur eine einzige FMN-Injektion zu apo-Dodecin erfolgte und die Abnahme der Fluoreszenz zeitabhängig untersucht wurde, zeigten, dass eine Sättigung erst nach mehreren Stunden eintrat. Dieser zeitabhängige Effekt erklärt die schlechte Reproduzierbarkeit der apparenten Dissoziationskonstanten, die bei Titration nach der ersten Methode, bei der die Emissions verschiedener, vorher zusammenpipettierter, Dodecin:Ligand-Verhältnisse gemessen wurde, erhalten wurden. Hier wurden die zuvor zusammenpipettierten Proben nicht lange genug, bzw. nicht gleich lang genug inkubiert, um reproduzierbare Werte zu erhalten.

Um diesen zeitabhängigen Effekt zu umgehen, der besonders bei der Bindung des ersten Flavindimers eine Rolle zu spielen scheint, wurden im Folgenden Fluoreszenztitrationen mit Dodecinlösungen durchgeführt, die bereits zu etwa 20 % endogenes FMN gebunden hatten. Bei dieser Titrationmethode wurde eine FMN-Lösung unter Rühren alle 2 Minuten mit der bereits endogenes FMN enthaltenden Dodecinlösung versetzt und die Extinktion am Emissionsmaximum gemessen. Für die Bindungsaffinität zwischen FMN und Dodecin konnte auf diese Weise ein K_D von 311 μ M nach Fitten nach einem 1:1 Bindungsmodell ermittelt werden (siehe Abb. 25 C).

A



B



C

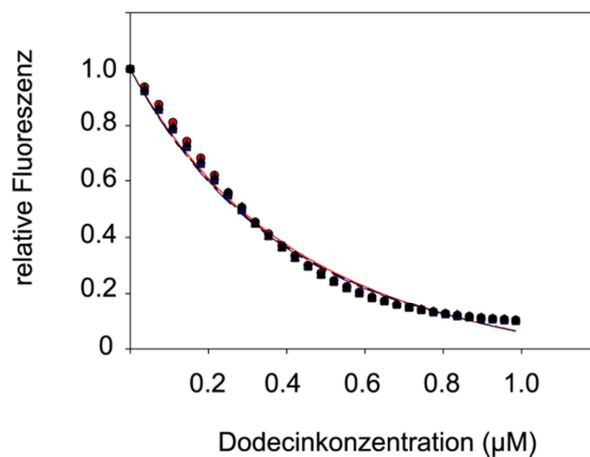


Abb. 25: Vergleich verschiedener Fluoreszenztitrationsmethoden zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten

A: Fluoreszenztitration durch Zusammenmischen verschiedener Dodecin:Flavinverhältnisse

Hier wurden FMN-Lösungen einer Endkonzentration von $5 \mu\text{M}$ mit unterschiedlichen apo-Dodecin-Konzentrationen ($1 \mu\text{M}$ - $25 \mu\text{M}$ Endkonzentration) inkubiert und dann die Emission bei 530 nm gemessen. Die relativen Fluoreszenzen wurden gegen die Proteinkonzentrationen aufgetragen und die erhaltenen Kurven nach einem 1:1 Bindungsmodell gefittet. Sie lieferten apparente Dissoziationskonstanten von $3.78 \cdot 10^{-7} \pm 8.18 \cdot 10^{-8} \text{ M}$ (schwarze Kreise mit schwarzer durchgezogenen Linie) bis $2.44 \cdot 10^{-5} \pm 2.73 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ (rote Quadrate mit roter gestrichelten Linie).

B: Fluoreszenztitration durch Hinzupipettieren

10 μL Injektionen einer 20 μM apo-Dodecinlösung wurden unter Rühren direkt in der Küvette zu 600 μL einer 2 μM FMN-Lösung gegeben und nach 5 min Inkubation die Extinktion bei 528 nm gemessen. Die relativen Fluoreszenzen wurden gegen die Proteinkonzentrationen aufgetragen, die resultierenden Bindungskurven konnten jedoch nicht nach einem 1:1 Bindungsmodell gefittet werden.

C: Fluoreszenztitration durch Hinzupipettieren unter Verwendung von bereits FMN-enthaltenden Dodecinlösungen

4 μL Injektionen einer 11.5 μM Dodecinlösung mit bereits endogen gebundenem FMN (entspricht 9.25 μM freiem Dodecin) wurden in 1 mL 198 nM FMN alle 2 Minuten bis zur Sättigung titriert. Für die Korrektur um die Fluoreszenz des bereits gebundenen endogenen FMNs wurde eine analoge Titration von Dodecin in Puffer durchgeführt. Die relativen Fluoreszenzen wurden gegen die Proteinkonzentration aufgetragen und die Dissoziationskurve unter Verwendung eines 1:1 Bindungsmodells gefittet. Hieraus resultierten apparente Dissoziationskonstanten von $3.29 \cdot 10^{-7} \pm 3.12 \cdot 10^{-8}$ M (rote Kurve), $2.93 \cdot 10^{-7} \pm 2.25 \cdot 10^{-8}$ M (blaue Kurve) und $3.05 \cdot 10^{-7} \pm 2.76 \cdot 10^{-8}$ M (schwarze Kurve). Üblicherweise wurden mindestens 3 Titrationen durchgeführt und eine Korrektur um die Fluoreszenz des endogen gebundenen FMNs und die Verdünnung vorgenommen.

Neben der Dissoziationskonstanten für FMN wurden analog auch die apparenten Dissoziationskonstanten für die Flavine FAD, Riboflavin und Lumiflavin sowie für das Flavinanalogon Lumichrom bestimmt (siehe Abb. 26 und Tab. 8).

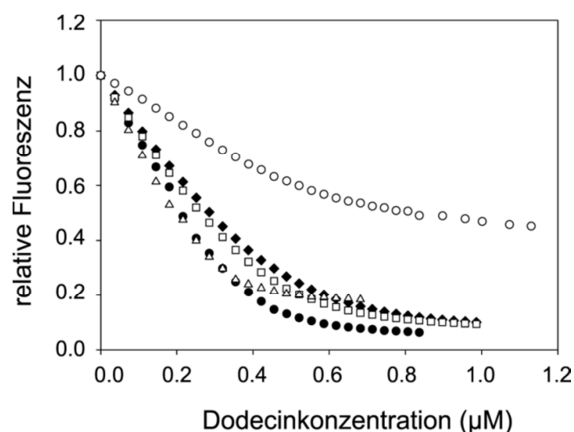


Abb. 26: Fluoreszenztitrationen zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten K_D

B: Die relativen Fluoreszenzemissionen von Lumichrome (Δ), Lumiflavin (\bullet), Riboflavin (\square), FMN (\blacklozenge) und FAD (\circ) in Abhängigkeit von der Dodecinkonzentration.

4 μL Injektionen einer 11.5 μM Dodecinlösung mit bereits endogen gebundenem FMN (entspricht 9.25 μM freiem Dodecin) wurden in 1 mL Flavinelösung alle 2 Minuten bis zur Sättigung titriert. Die Ligandenkonzentrationen betrugen 200 nM für FAD und Lumichrom, 203 nM für Riboflavin, 198 nM für FMN und 232 nM für Lumiflavin. Für die Korrektur um die Fluoreszenz des bereits gebundenen endogenen FMNs wurde eine analoge Titration von Dodecin in Puffer durchgeführt. Die relativen Fluoreszenzen wurden gegen die Proteinkonzentration aufgetragen und die Dissoziationskurve unter Verwendung eines 1:1 Bindungsmodells gefittet.

Tab. 8: Dissoziationskonstanten bei der Bindung von Flavinen an das *T. thermophilus* Dodecin

Flavin	Dissoziationskonstante K_D
Lumichrom	$80 \pm 3 \text{ nM}$
Lumiflavin	$141 \pm 11 \text{ nM}$
Riboflavin	$233 \pm 37 \text{ nM}$
FMN	$311 \pm 18 \text{ nM}$
FAD	$589 \pm 26 \text{ nM}$

Zur näheren Untersuchung der bereits erwähnten Zeitabhängigkeit bei der Bindung des Flavinliganden an das apo-Dodecin wurde einmalig eine apo-Dodecinlösung zu einer FMN-Lösung unter Rühren pipettiert und die Emissionsänderung über mehrere Stunden hinweg bis zur Sättigung beobachtet. Abb. 27 zeigt die Gleichgewichtseinstellung bei 20 °C; hier wurde eine endgültige Sättigung etwa nach 6 Stunden erreicht. Eine Erhöhung der Temperatur von 20 auf 37, 50 und 65 °C führte zu einer schnelleren Abnahme der Fluoreszenz und somit zu einem schnelleren Einstellen des Bindungsgleichgewichtes. Durch Fitten der bei den verschiedenen Temperaturen erhaltenen Kurven an die Formel des exponentiellen Zerfalls konnten folgende Halbwertszeiten ermittelt werden:

Tab. 9: Halbwertszeiten der Bindung von FMN an apo-Dodecin bei verschiedenen Temperaturen

Temperatur (°C)	Halbwertszeit (min)
20	166
37	86
50	41
65	25

Deutlich zeigt sich hier eine Abnahme der Halbwertszeit mit der Temperatur (siehe auch Abb. 27 B). Die Geschwindigkeit dieser Bindung in Abhängigkeit von der Temperatur lässt sich mit der Arrhenius-Gleichung beschreiben, und durch Erstellen eines Arrhenius-Plots konnte eine Aktivierungsenergie E_A von $35.6 \pm 2.4 \text{ kJ/mol}$ bestimmt werden.

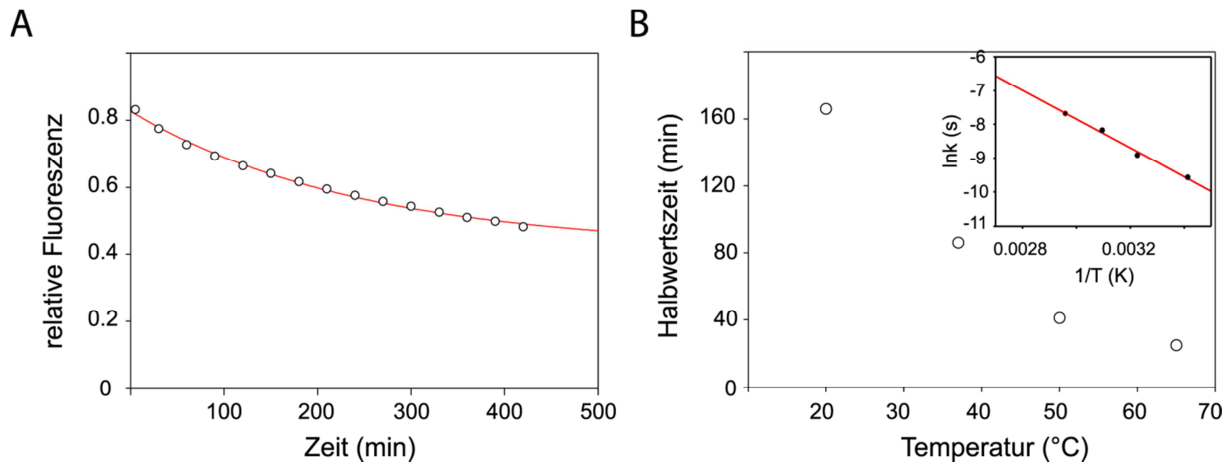


Abb. 27: Zeitabhängigkeit der Flavinbindung.

A: Abnahme der relativen Fluoreszenz bei 20 °C in Abhängigkeit von der Zeit. Zu 600 μL einer 2 μM FMN-Lösung wurden 100 μL einer 100 μM apo-Dodecin-Lösung hinzutitriert und die Mischung für mehrere Stunden unter Rühren bei 20 °C inkubiert. Die Fluoreszenz wurde vor Zugabe, 5 min nach Zugabe und dann jede 30 min gemessen. Analog zur Messung bei 20 °C wurde die relative Fluoreszenz bei 37, 50 und 65 °C gemessen. Die relativen Fluoreszenzemission bei 529 nm wurden gegen die Zeit aufgetragen und die Daten an eine Formel des exponentiellen Zerfalls gefittet (rote Linie). Für 20, 37, 50 und 65 °C betrugen die auf diese Weise bestimmten Halbwertszeiten 166 min (20 °C), 86 min (37 °C), 41 min (50 °C) und 25 min (65 °C).

B: Temperaturabhängigkeit der Flavinbindung. Die für 20, 37, 50 und 65 °C bestimmten Halbwertszeiten wurden gegen die Temperatur aufgetragen. Kleine Abbildung: Ein Arrhenius-Plot liefert nach linearem Fit (rote Linie) eine Aktivierungsenergie von 35.6 ± 2.4 kJ/mol.

3.1.5.2 Bestimmung der Dissoziationskonstante für FMN durch Isothermale

Titrationsskalorimetrie

Die FMN-Bindung an das apo-*Thermus thermophilus* Dodecin wurde mittels isothermaler Titrationsskalorimetrie (ITC) bestimmt. Hierzu wurde eine FMN-Lösung zu apo-Dodecin titriert (siehe Abb. 28), welches zuvor durch TCA-Fällung und anschließende Rückfaltung durch Dialyse präpariert worden war.

Die erhaltenen Bindungsisothermen (siehe Abb. 28) konnten mittels eines 1:1 Bindungsmodells gefittet werden und lieferten eine moderate Dissoziationskonstante von 0.91 μM und eine Stöchiometrie von nur 14.3 % gebundenem FMN. Für die Freie Enthalpie ΔG ergab sich ein Wert von -34.922 kJ/mol, wobei die Bindung von FMN an das *T. thermophilus* Dodecin sowohl enthalpisch als auch entropisch begünstigt zu sein scheint ($\Delta H = -30.485$ kJ/mol, $\Delta S = 0.015$ kJ/mol).

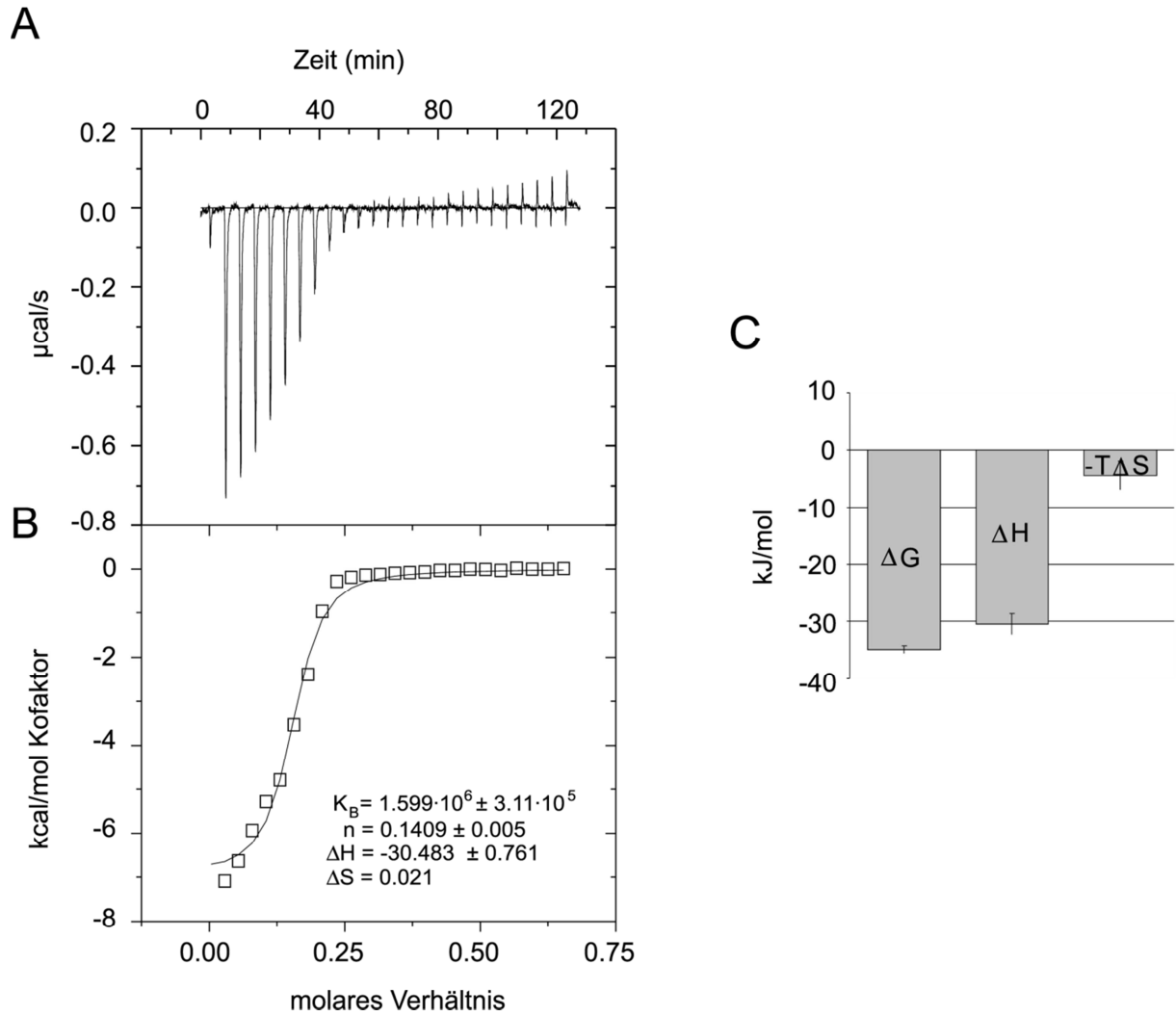


Abb. 28: ITC-Messung der FMN-Bindung an apo-Dodecin

A: ITC-Titration von apo-Dodecin (110 μM) mit 10 μL -Aliquots FMN-Lösung (372 μM) in 20 mM Tris/HCl, pH 8.0; 100 mM NaCl bei 25 $^{\circ}\text{C}$.

B: Bindungsisotherme für obige Titration. Die hinzugefügte Linie entspricht dem besten Fit dieser Daten an ein 1:1 Bindungsmodell und liefert für diese Titration eine Bindungskonstante von $K_B = 1.599 \cdot 10^6 \pm 3.11 \cdot 10^5 \mu\text{M}$, eine Stöchiometrie von $n = 0.1409 \pm 0.005$ sowie eine Enthalpie von $\Delta H = -30.483 \pm 0.761 \text{ kJ/mol}$ und eine Entropie von $\Delta S = 0.021 \text{ kJ/mol}$. Insgesamt wurden 4 Titrationsen durchgeführt, wobei sich eine mittlere Bindungskonstante von $K_B = 1.094 \cdot 10^6 \pm 4.96 \cdot 10^5$ und eine Stöchiometrie von $n = 0.143 \pm 0.004$ ergab.

C: Balkendiagramm der thermodynamischen Parameter der obigen Titrationsen. Für obige Titrationsen wurde eine mittlere Enthalpie von $\Delta H = -30.485 \pm 1.837 \text{ kJ/mol}$ und eine mittlere Entropie von $\Delta S = 0.015 \pm 0.008 \text{ kJ/mol}$ erhalten. Damit ergibt sich eine Freie Enthalpie $\Delta G = -34.922 \pm 0.687 \text{ kJ/mol}$.

3.1.6 Redoxchemie des *T. thermophilus* Dodecins

3.1.6.1 Chemische Reduktion des *T. thermophilus* Wildtyp Dodecins

Um die Redoxaktivität des *T. thermophilus* Dodecins, die maßgeblich durch das bislang einmalige π -stacking der Flavindimere beeinflusst wird, näher zu charakterisieren, wurden in Zusammenarbeit mit Antonio Pierik (Fachbereich Biologie) und Erik Schleicher (Universität Freiburg) verschiedene Versuche unternommen, die Dodecin-gebundenen Flavine chemisch oder photochemisch zu reduzieren. Verwendet wurden übliche Reduktionsmittel wie 5'-Deazaflavin, EDTA, DTT oder Natriumdithionit, die jedoch nur geringe Mengen reduziertes Flavin lieferten. Auch Triplettsspektren konnten weder vom WT Dodecin noch von der W38Y-Mutante erhalten werden; allein die W38F-Mutante lieferte ein detektierbares Triplettssignal (siehe 3.1.6.3).

Volle Reduktion nach Durchlaufen eines detektierbaren Semiquinonzustandes wurde durch die Verwendung von Titan(III)citrat erreicht, das ein Redoxpotential von -480 mV bei pH 7 [150] besitzt (siehe Abb. 29). Nach 30-sekündiger Inkubation des Dodecins mit Titan(III)citrat unter anaeroben Bedingungen war bereits die Bildung des Semiquinons zu beobachten (blaue Linie in der kleinen Abbildung), das nach 300 s vollständig in den reduzierten Zustand übergegangen war. Durch Kontakt mit Sauerstoff konnte der oxidierte Zustand wieder herbeigeführt werden.

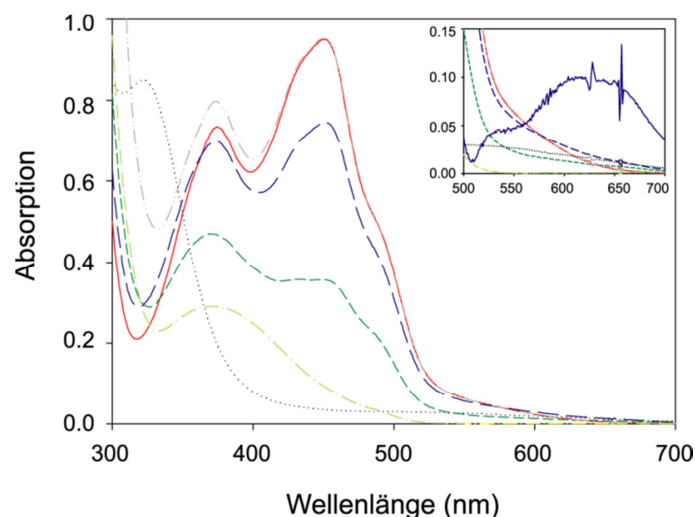


Abb. 29: Chemische Reduktion des *T. thermophilus* Dodecins mit Titan(III)citrat

In diesem Experiment wurden 1 mL einer Dodecinlösung ($c_{\text{FMN}}=0.1$ mM) nach der Aufnahme eines Absorptionsspektrums des oxidierten Zustands (rote Linie) unter anaeroben Bedingungen mit 20 μL einer 1 mM Titan(III)citratlösung inkubiert. Die blau, grün und hellgrün gestrichelten Linien zeigen das Absorptionsspektrum nach 30, 60 und 300 s. Schließlich wurde durch Öffnen der Küvette die Rückoxidation herbeigeführt (grau gestrichelte und gepunktete Linie). Die schwarz gepunktete Linie entspricht dem Absorptionsspektrum des Titan(III)citrats. Zum besseren Erkennen des gebildeten Semiquinons wurde der Bereich ab 500 nm gesondert dargestellt und außerdem der Graph der 30 s Inkubation mit dem Faktor 8 multipliziert (blaue Linie). Die Spektren wurden um den Verdünnungsfaktor und die Titan(III)citrat-Absorption korrigiert.

Eine Titration des Dodecins mit Titan(III)citrat bis zur vollreduzierten Spezies wies nach Auftragung der gemessenen Absorption bei 452 nm gegen die Titan(III)citratkonzentration einen sigmoidalen Kurvenverlauf auf (hier nicht gezeigt). Diese Titration diente dazu, festzustellen, welche Titan(III)citratmengen notwendig waren, um die EPR-aktive Semiquinonspezies zu erhalten. Unter analogen Bedingungen wurden Proben präpariert, die dem oxidierten, dem zu 25 %, 50 % und 75 % reduzierten sowie dem vollreduzierten Zustand entsprachen. Diese fünf Proben wurden mittels EPR vorcharakterisiert (hier nicht gezeigt). Wie erwartet, zeigten nur die Proben der teilweise reduzierten Proteinlösungen ein EPR-Signal.

3.1.6.2 Magnetische Resonanz-Spektroskopie des chemisch reduzierten *T. thermophilus* Wildtyp Dodecins

In Zusammenarbeit mit Erik Schleicher und Stefan Weber (Universität Freiburg) wurden continuous-wave EPR- und gepulste ENDOR-Spektren des mit Titan(III)citrat zum Semiquinon reduzierten *T. thermophilus* Dodecins aufgenommen. Hierfür wurde die zu 50 %

reduzierte Dodecinprobe verwendet (siehe Abb. 29), für die bereits EPR-Aktivität nachgewiesen werden konnte.

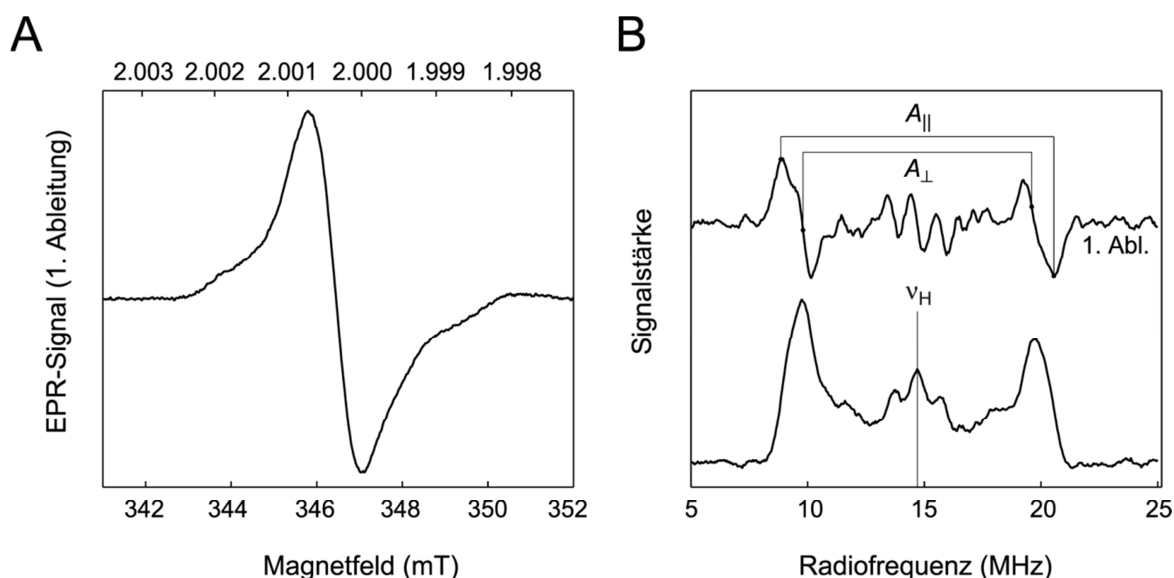


Abb. 30: Paramagnetische Resonanz-Spektroskopie des chemisch reduzierten *T. thermophilus* Dodecins

A: Continuous-Wave EPR-Spektrum des *T. thermophilus* Dodecins bei 120 K. Das Spektrum wurde bei einer Mikrowellenfrequenz von 9.7147 GHz, einer Mikrowellenattenuation von 41 dB (0.016 mw), einer Modulation des elektrischen Feldes von 0.3 mT, einer Modulationsfrequenz von 100 kHz und einer Detektionszeitkonstanten von 40.96 ms aufgenommen. Das Signal um $g = 2.0035$ ist charakteristisch für ein Flavinradikal, während sich das kleine Signal um 351 mT dem Ti^{3+} zuordnen lässt, das üblicherweise Resonanzen um $g=1.90-1.98$ mit großer inhomogener Linienbreite aufweist [151].

B: Gepulstes Davies ENDOR-Spektrum des *T. thermophilus* Dodecins, das bei 80 K, einem magnetischen Feld von 345.25 mT und einer Mikrowellenfrequenz von 9.6813 GHz aufgenommen wurde. ν_H kennzeichnet die Protonen Larmor Frequenz. Eine hohe Hyperfein-Kopplung der α -Methyl-Protonen von $A_{\perp} = 9.8$ MHz, und $A_{\parallel} = 11.7$ MHz weist auf eine geringe Elektronenspindichte an der 8α -Methylgruppe und damit auf eine geringe Delokalisierung des Flavinradikals hin.

Das cw-EPR-Spektrum zeigt ein Signal mit für Radikale typischem Linienmuster bei $g=2.0035(5)$, das aufgrund dieser Lage charakteristisch für ein Flavinradikal ist. Eine Peak-zu-Peak EPR-Linienbreite von 1.3 mT konnte gemessen werden, was darauf hinweist, dass es sich bei dem erzeugten Semiquinon um die anionische Form des Flavin-Semiquinons handelte. Denn während das neutrale Flavinradikal ($FMN_{rad}H$) eine typische Peak-zu-Peak Linienbreiten von 2.0 mT aufweist, besitzt das anionische Radikal aufgrund der Deprotonierung des N(5)-Atoms eine reduzierte Linienbreite von nur 1.3-1.5 mT [152, 153]. Da eine Reduzierung der Linienbreite jedoch auch bei Dimeren bzw. N-meren elektronisch stark interagierender Flavine beobachtet werden kann, wurden außerdem ENDOR-Experimente durchgeführt. Diese dienten dazu, den genauen Effekt, der zur Verkleinerung der

Linienbreite führte, näher zu untersuchen. Hier konnte ein Linienpaar mit axialer Symmetrie beobachtet werden, das sich der Hyperfeinkopplung der drei 8α -Methyl-Protonen zuordnen lässt: $A_{\perp} = 9.8$ MHz, $A_{\parallel} = 11.7$ MHz, welche einen isotropen Wert von $A_{\text{iso}} = 10.4$ MHz liefert. Dieser Wert ist verglichen mit anderen sowohl anionischen als auch neutralen Flavoproteinradikalen sehr groß, so dass eine Delokalisierung des Flavinradikals, die sich in einer Halbierung der Hyperfeinkopplung zeigen würde, ausgeschlossen werden kann. Da dementsprechend die elektronische Kopplung zwischen den beiden Flavinmonomeren in der radikalischen Form sehr gering ist, ist die im EPR-Spektrum beobachtete geringe Linienbreite auf die anionische Form des Radikals zurückzuführen.

3.1.6.3 Zeitaufgelöste EPR-Spektroskopie des *T. thermophilus* Dodecins

Transiente EPR-Spektren des WT *T. thermophilus* Dodecins sowie der beiden Punktmutanten W38Y und W38F wurden in Zusammenarbeit mit Erik Schleicher und Stefan Weber (Universität Freiburg) aufgenommen. Wie bereits erwähnt, weist nur die W38F-Mutante ein Spektrum auf, während sowohl beim WT als auch bei der W38Y-Mutante keinerlei Signal zu erkennen ist (Abb. 31 A). Dies weist darauf hin, dass sowohl beim WT Protein als auch bei der W38Y-Mutante entweder kein *Intersystem-Crossing* stattfindet oder die Relaxation vom angeregten zurück in den Grundzustand so schnell stattfindet, dass es außerhalb der Zeitskala von *Intersystem-Crossing* liegt. Messungen mit der W38F-Mutante dagegen zeigen ein gut sichtbares transientes Signal, welches nach $1\ \mu\text{s}$ maximale Signalintensität und eine Lebensdauer von ca. $8\ \mu\text{s}$ besitzt (siehe Abb. 31 B). Die Breite des Spektrums mit ca. 1000 G lässt auf eine starke Interaktion der beiden ungepaarten Elektronenspins und damit auf eine sehr geringe Distanz der beiden zueinander schließen. Dies ist charakteristisch für einen Triplettzustand, bei dem die beiden ungepaarten Elektronenspins auf einem Molekül lokalisiert sind. Vergleiche mit bereits aufgenommenen Triplett-spektren von FMN in wässriger Lösung bzw. in verschiedenen Phototropinen zeigen, dass eine starke Ähnlichkeit von Triplettparametern der W38F-Mutante mit denen von neutralem FMN in Lösung besteht. Vermutlich findet durch die Mutation des Tryptophanrestes zum Phenylalanin eine starke Destabilisierung der elektronischen Interaktion zwischen Kofaktor und aromatischer Aminosäure statt, die zu einer Abschwächung der nicht-kovalenten Bindung führt. Diese hat eine langsamere Deaktivierung des angeregten Flavins und damit das Auftreten eines Triplettzustandes zur Folge.

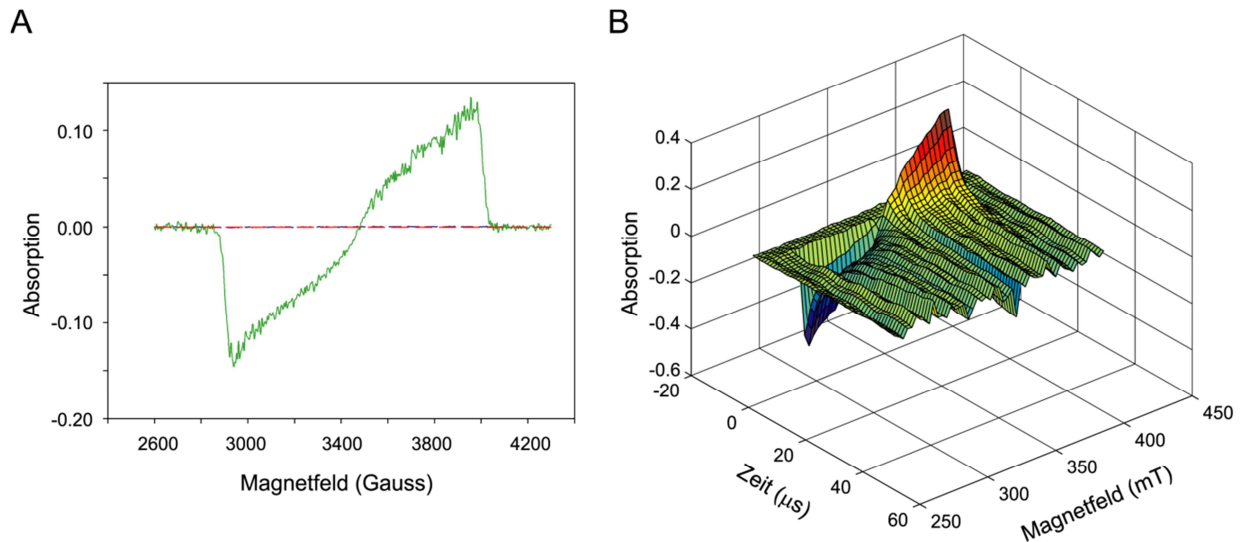


Abb. 31: EPR-Spektren der Triplettzustände des *T. thermophilus* Dodecins

A: Transientes-EPR-Spektrum des WT-Dodecins (rot), der W38Y-Mutante (blau) und der W38F-Mutante (grün) ca. 1 μ s nach Laseranregung. Allein die W38F-Mutante zeigt ein messbares Triplettssignal.

B: Komplettes zeitabhängiges EPR-Spektrum der W38F-Mutante (Erik Schleicher, persönliche Mitteilung).

3.1.6.4 Reduktion der *T. thermophilus* Dodecin W38F-Mutante durch Röntgenstrahlung

Die *T. thermophilus* Dodecin W38F-Mutante wurde durch Röntgenstrahlung reduziert. Hierzu wurde die Absorption der W38F-Mutante in kristallinem Zustand während der Bestrahlung mit Röntgenlicht der Wellenlänge von 0.933 Å zeitabhängig aufgenommen (siehe Abb. 32 B). Parallel dazu wurden die Absorptionsänderungen der Dodecin-relevanten Wellenlängen bei 380, 450, 490, 545 und 600 nm in verschiedenen Kanälen gesondert detektiert (Abb. 32 A). Verwendet wurde der Kristall BM221, der durch die Kristallisation der FMN-rekonstituierten W38F *T. thermophilus* Dodecin-Mutante (Kristall BM221, c=25 mg/mL, kokristallisiert mit zweifachem CoA-Überschuss) bei der Bedingung 0.2 M Na-Citrat, 0.1 M Tris/HCl, pH 8, 27.5 % PEG 400 gewachsen war und die Form eines großen orthorhombischen gelben Plättchens besaß (siehe Abb. 33 G).

Zu beobachten war eine rapide Abnahme des Absorptionsmaximums des oxidierten Zustands bei 450 nm und eine allmähliche Zunahme im Bereich von 550-650 nm, die dem neutralen, blauen Semiquinon-Zustand (Absorptionsmaximum 600 nm) entspricht (Abb. 32 A und B). Wurde der Röntgenstrahl kurz unterbrochen, wie geschehen nach 358 s, fand eine leichte Rückoxidation statt, die Absorptionen bei 450 und 490 nm nahmen wieder zu, die bei 545 und 600 nm ab. Wurde die Bestrahlung fortgesetzt (nach 864 s), fand weitere Reduktion statt.

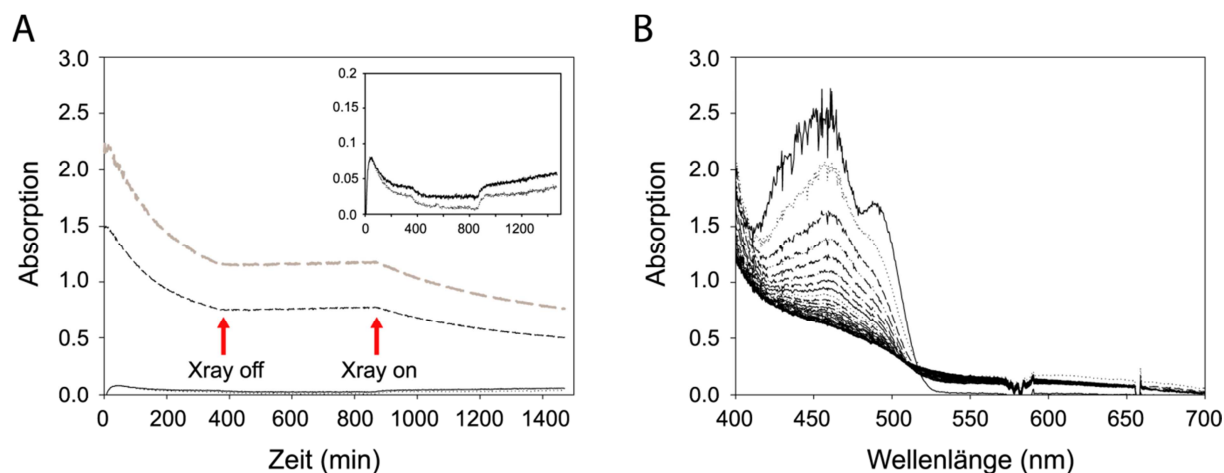


Abb. 32: Reduktion der *T. thermophilus* W38F-Mutante durch Röntgenstrahlung

Absorptionsmessungen am Mikrospektralphotometer (Beamline ID14-2, ESRF, Grenoble) nach Bestrahlung des Kristalls BM221 der *T. thermophilus* W38F-Mutante mit Röntgenstrahlung der Wellenlänge 0.933 Å und einem Photonenfluss von $8.1 \cdot 10^{10}$ Photonen/s.

A: Darstellung ausgewählter Wellenlängen in Abhängigkeit von der Zeit. Gemessen wurden die Wellenlängen 380 nm (hier nicht dargestellt, da zu viel Hintergrund), 450 nm (grau lang gestrichelt), 490 nm (schwarz kurz gestrichelt), 545 nm (schwarz) und 600 nm (gepunktet). Zur besseren Ansicht ist der Bereich von OD 0-0.2 vergrößert dargestellt. Über einen Zeitraum von 1470 Sekunden wurde alle 1.843 s ein Absorptionsspektrum von 188-1097 nm aufgenommen (siehe B). Nach 358 s wurde die Bestrahlung unterbrochen, beim Zeitpunkt 864 s fortgesetzt (rote Pfeile).

B: Absorptionsspektren aufgenommen wie unter A beschrieben. Dargestellt wurde nur jedes 50. Spektrum im Absorptionsbereich von 400-700 nm.

3.1.7 Strukturbestimmung des *T. thermophilus* Dodecins

Um Strukturinformationen über das *T. thermophilus* Dodecin zu erhalten, wurden bereits während der Diplomarbeit erste Kristallisationsversuche mit dem aufgereinigten Dodecin unternommen. Hierzu wurden sowohl das Dodecin mit den endogen gebundenen Kofaktoren als auch Flavin (in diesem Falle Riboflavin)- rekonstituiertes Proteinmaterial verwendet. (Nähere Informationen zu den verwendeten Proteinlösungen und Screens sowie die aufgezeichneten Beobachtungen findet sich im Anhang 8.) Zwar wurden für das Riboflavin-rekonstituierte Dodecin in einem ersten Screen regelmäßig erscheinende Kristalle erhalten, die entweder optimiert oder bereits an der Drehanode getestet wurden, doch reichte die Qualität der Kristalle noch nicht zur Aufnahme eines Datensatzes aus. Das Dodecin mit endogen gebundenen Kofaktoren lieferte dagegen bereits im ersten Screen Kristalle, die zur Aufnahme eines vollständigen Datensatzes geeignet waren. Daher konnte die Struktur des nicht-rekonstituierten WT Dodecins bereits im Laufe der Diplomarbeit bei einer Auflösung 2.4 Å gelöst werden; die anschließende Verfeinerung erfolgte in dieser Arbeit.

Außerdem wurden die Strukturen des FMN-rekonstituierten WT Dodecins sowie Strukturen der aufgereinigten Mutanten (W38Y, W38F, R45A, R65A) – teilweise mit endogen gebundenen Kofaktoren, teilweise FMN-rekonstituiert – gelöst und verfeinert. Eine Übersicht über die gelösten Strukturen gibt Tab. 10.

Tab. 10: gelöste *T. thermophilus* Dodecin Kristallstrukturen

Bezeichnung	Protein	Auflösung in Å	Bemerkungen	PDB-Eintrag
BM1a6a	<i>T. thermophilus</i> Dodecin nicht-rekonstituiert	19.87-2.40	Komplex mit endogen gebundenem FMN	2v21
BM27a3a	<i>T. thermophilus</i> Dodecin FMN-rekonstituiert	24.76-2.60	Komplex mit FMN und endogen gebundenem CoA	2v18
BM22d1	<i>T. thermophilus</i> Dodecin W38Y-Mutante nicht-rekonstituiert	128.0-3.10	Komplex mit endogen gebundenem FMN und CoA	
BM31a2	<i>T. thermophilus</i> Dodecin W38F-Mutante nicht-rekonstituiert	116.3-2.48	Komplex mit endogen gebundenem FMN und CoA	
BM222	<i>T. thermophilus</i> Dodecin W38F-Mutante FMN-rekonstituiert kokristallisiert mit CoA	10.00-1.5	Komplex mit FMN und CoA	2vyx
BM53c1	<i>T. thermophilus</i> Dodecin R45A-Mutante FMN-rekonstituiert	25.00-2.58	Komplex mit FMN und endogen gebundenem CoA	2v19
BM13	<i>T. thermophilus</i> Dodecin R65A-Mutante nicht-rekonstituiert	15.00-1.08	Komplex mit endogen gebundenem FMN und CoA	
BM11/r65anca4	<i>T. thermophilus</i> Dodecin R65A-Mutante FMN-rekonstituiert	14.88-1.40	Komplex mit FMN und endogen gebundenem CoA	2ux9

3.1.7.1 Kristallisation des *T. thermophilus* Dodecins

In diesem Abschnitt wird allgemein das Vorgehen bei der Kristallisation des WT Dodecins sowie seine Mutanten beschrieben und beobachtete Ergebnisse zusammengefasst. Abbildungen der Kristalle, die letztendlich zur Aufnahme eines prozessierbaren Datensatzes

führten, sowie eine kurze Beschreibung der Kristallisationsmethode sind Inhalt der Abb. 33 und Anhang 8.

Zur Strukturbestimmung des Dodecins und seiner Mutanten insbesondere im Hinblick auf die Kofaktorbinding wurden Proteinlösungen einer Reinheit von etwa 95 % und einer Konzentration von mindestens 7 mg/mL verwendet (genauere Angaben zu den verwendeten Proteinlösungen finden sich im Anhang 8). Da die für das WT Dodecin gefundenen Kristallisationsbedingungen aufgrund mäßiger Streukraft und relativ hoher Mosaizität noch nicht die optimalen Bedingungen zu sein schienen, wurde für jede Mutante ein kompletter Screen durchgeführt, anstatt die bereits gefundenen Kristallisationsbedingung für die einzelnen Mutanten zu optimieren. Auch bei der Verwendung einer neuen Proteincharge wurde stets ein neuer Screen auspipettiert, da sich zeigte, dass verschiedene Chargen des gleichen Proteins – vermutlich aufgrund unterschiedlicher Flavinglehalte – in ihren Kristallisationseigenschaften nicht übereinstimmten.

Da bereits beim WT Dodecin die Bildung verschiedener Kristallformen bei einer Anzahl vollkommen unterschiedlicher Kristallisationsbedingungen beobachtet werden konnte – eine Eigenschaft, die auch die Mutanten aufwiesen – konnten bereits durch Verwendung des Sigma Basic Screens im *hanging drop* Verfahren viele Kristalle erhalten werden. So waren in 5-10 % der Bedingungen kristallines Material wie Mikrokristalle, Nadeln oder Cluster vorhanden, die Bildung optisch einheitlich erscheinender Einkristalle konnte in 2-5 % der Bedingungen beobachtet werden. Wie auch schon bei WT Dodecin beobachtet, bestand eine hohe Tendenz zur spontanen Präzipitation; so trat bei 50-60 % der Bedingungen sofortige Präzipitation auf. Oft löste sich das Präzipitat jedoch innerhalb weniger Wochen auf und Kristalle wuchsen aus der präzipitierten Phase. Besonders PEGs wie PEG 4000 und 8000 begünstigten die Präzipitation, aber auch MPD und Isopropanol waren oft in den spontan ausfallenden Tropfen enthalten.

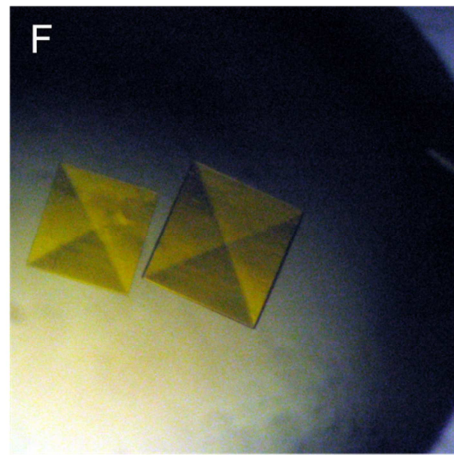
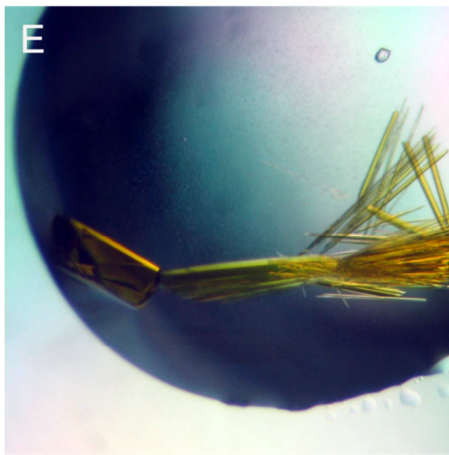
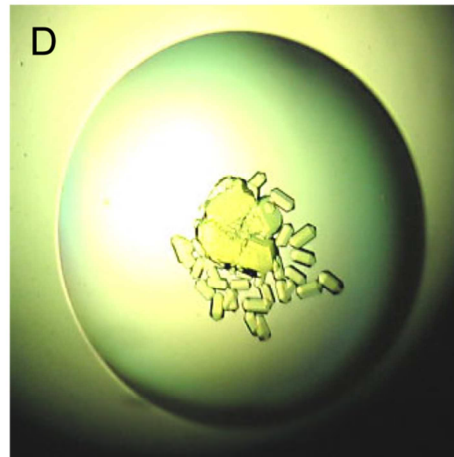
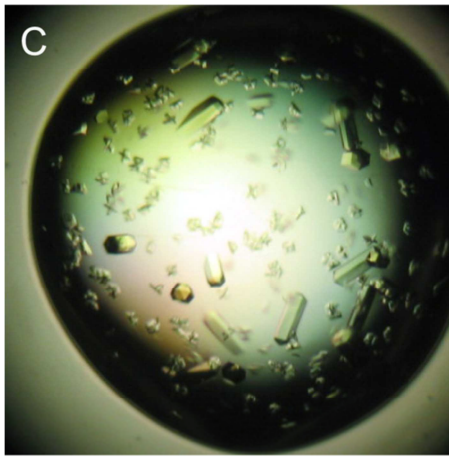
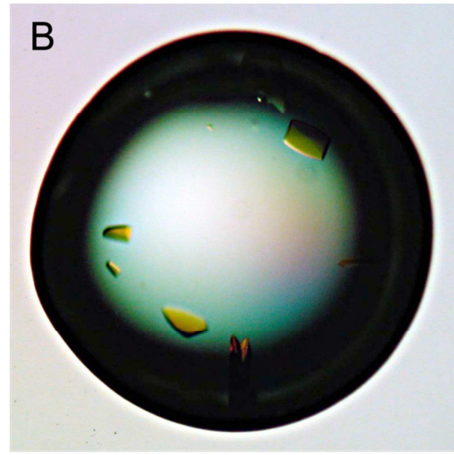
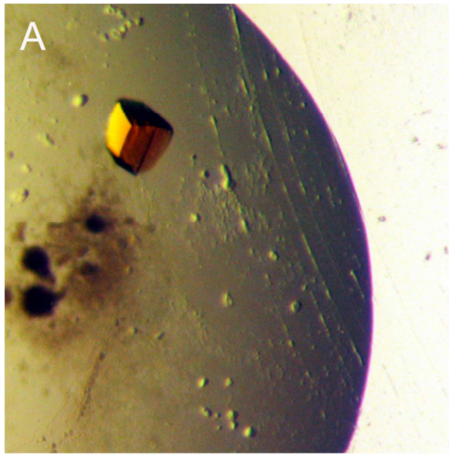
Aufgrund der großen Anzahl der Kristalle, von denen die am besten erscheinenden entweder durch Variation von pH-Wert und Fällungsmittelkonzentration optimiert oder direkt röntgenkristallographisch charakterisiert wurden, schien es zunächst nicht notwendig, unter Zuhilfenahme des Kristallisationsroboters Cartesian MycrosysTM SQ4000 weitere Screens zusätzlich zum Sigma Basic Screen auszupipettieren. Doch zeigte die Kristallisation der R65A-Mutante, die automatisiert im *sitting drop* Verfahren von einem Kristallisationsroboter durchgeführt wurde, und bei der zusätzlich zum Sigma Basic Screen der Sigma Extension-, der Sigma Cryo-, der Nextal Classic- sowie der Nextal Classic Lite Screen verwendet wurden,

dass die im Sigma Basic Screen enthaltenen Lösungen nicht optimal zur Kristallisation des Dodecins geeignet sind: Die Fällungsmittel Ammoniumphosphat und Hexandiol, die zur Ausbildung sehr schöner Einkristalle (siehe Abb. 33) führen, sind im Sigma Basic Screen kaum bzw. gar nicht vorhanden. Zudem konnte beobachtet werden, dass unter ansonsten identischen Bedingungen Lösungen gleicher Zusammensetzung als Teil des Nextal Screens Kristalle lieferte, im Sigma Screen jedoch nur Präzipitat oder mikrokristallines Material ergaben. Auch wurde es durch das Testen von annähernd 500 Kristallisationslösungen erst möglich, Tendenzen zu erkennen, die vorher aufgrund der relativ geringen Datenmenge nicht klar ersichtlich waren:

Kaum zur Kristallisation des *T. thermophilus* Dodecins geeignet sind die Alkohole Ethanol, tert. Butanol und Ethylenglykol (hier bleiben die Tropfen meist klar) während Hexandiol, Isopropanol und MPD zur Präzipitation und oft auch zur Kristallbildung führen.

PEGs wie PEG 4000 oder 8000 führen in Anwesenheit von Salzen meist zur spontanen Präzipitation; Kristalle – meist in Form von Clustern oder Mikrokristallen – bilden sich dann oftmals nach einigen Wochen in Tropfen, die zusätzlich Salze wie NaOAc, NaCitrat oder Sulfat (Lithiumsulfat, Ammoniumsulfat) enthalten. Generell führt die Anwesenheit obiger Salze – entweder als Salzzusatz, als Pufferkomponente (NaOAc, NaCitrat) oder auch als zusätzliches Fällungsmittel (Ammoniumsulfat, Lithiumsulfat, NaOAc) – häufig zur Kristallbildung. Als alleinige Fällungsmittel sind sie jedoch in den meisten Fällen nicht geeignet, die Tropfen bleiben klar, oder es bildet sich nur feines Präzipitat.

Hohe Fällungsmittelkonzentrationen führen im Allgemeinen wie erwartet häufiger zur Präzipitation als geringe, und damit auch häufiger zur Kristallbildung. So wurden z.B. mit dem im Nextal Classic Screen weitaus mehr Einkristalle als im Nextal Classic Lite Screen erhalten. Der Einfluss des pH-Wertes scheint nicht allzu groß zu sein; da das *T. thermophilus* Dodecin einen pI von 5.8 besitzt (die Mutanten weisen teilweise einen pI von 5.4 auf), kann die Kristallisation vor allem bei mittleren bis geringen pH-Werten beobachtet werden, doch kristallisierte dieses Protein auch bei pH 8.5. Einen ebenfalls geringen Einfluss besitzt die Proteinkonzentration: In nur wenigen Fällen finden sich bei hohen Konzentrationen Kristalle, in der verdünnten Proteinlösung jedoch nicht.



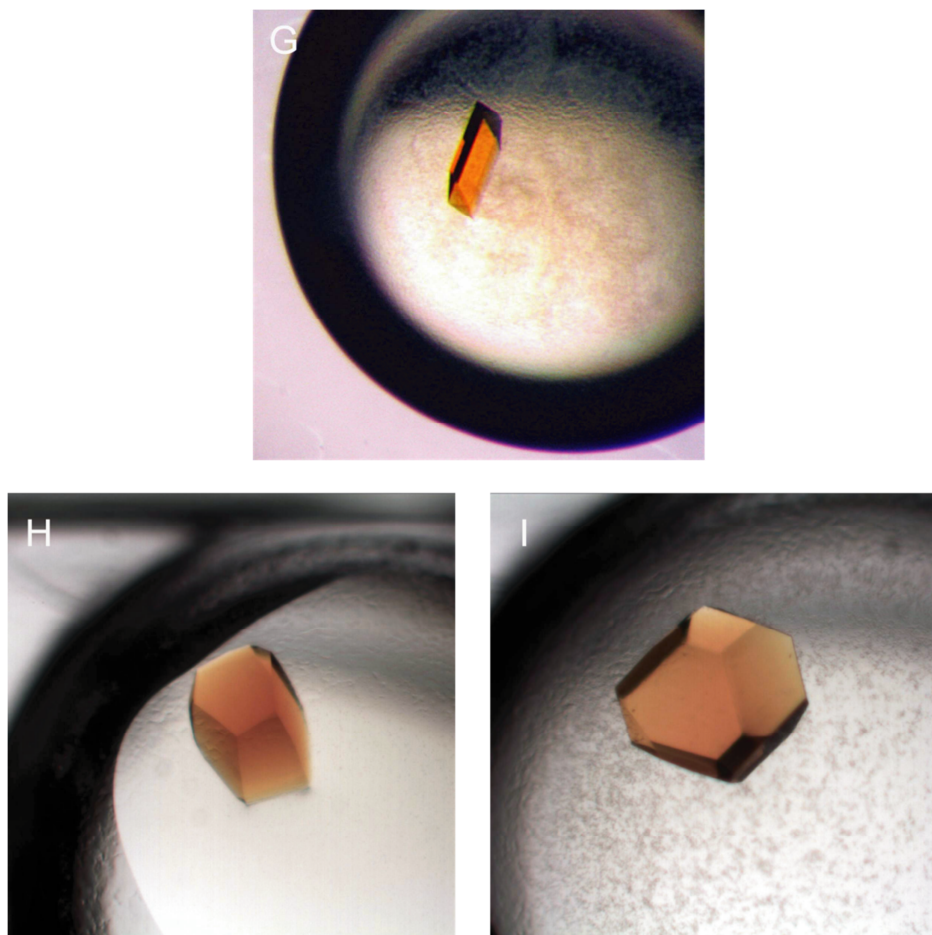


Abb. 33: Kristallisation des *T. thermophilus* Dodecins

A: Tetragonale Kristalle des nicht-rekonstituierten *T. thermophilus* WT Dodecins einer Kantenlänge von 150 μm konnten bereits aus dem ersten Screen unter der Bedingung 0.2 M Magnesiumacetat, 0.1 M Cacodylat, pH 6.5, 30 % MPD (SB, Lsg. 21) erhalten werden. Diese Kristalle wurden an der Drehanode aufgesetzt und lieferten einen Datensatz einer Auflösung von bis zu 2.4 \AA [146].

B: Tieforange Kristalle des FMN-rekonstituierten WT Dodecins erschienen nach bereits einer Woche durch Optimierung der Bedingung 0.2 M NaCitrat, 0.1 M Tris/HCl, pH 8.5, 30 % PEG 400 (SB, Lsg. 13) im mittleren Fällungsmittelbereich (25-30 %). Aufsetzen der Kristalle an der Drehanode lieferte einen 2.6 \AA Datensatz.

C: Nahezu farblose Kristalle der nicht-rekonstituierten W38Y-Mutante wurden durch Screening bei der Bedingung 0.05 M HEPES, pH 7.5, 5 % Isopropanol, 10 % PEG 4000 (SB, Lsg. 41 1:1) erhalten. Die säulenförmigen Kristalle mit einer Länge von etwa 400 μm lieferten am Synchrotron (Beamline BW7A, DESY, Hamburg) einen Datensatz mit einer Auflösung von bis zu 3.1 \AA .

D: Kurze leicht gelblich gefärbte Säulen konnten von der nicht-rekonstituierten W38F Mutante durch Optimierung der Bedingung 0.05 M HEPES, pH 7.5, 5 % Isopropanol, 10 % PEG 4000 (SB, Lsg. 41 1:1) innerhalb weniger Tage erhalten werden. Obwohl die Kristalle an der Drehanode nur geringes Streuvermögen aufwiesen, konnte am Synchrotron (Beamline X0665A, SLS, Villigen, Schweiz) ein 2.48 \AA Datensatz gesammelt werden.

E: Tiefgelbe Kristalle der FMN-rekonstituierten W38F-Mutante kristallisierten in Form von Nadelbüscheln oder säulenförmigen Einkristallen in Gegenwart von zwei Äquivalenten CoA durch Optimierung der Bedingung 0.2 M Ammoniumacetat, 0.1 M NaCitrat, 30 % MPD (NC, Lsg. 17) innerhalb weniger Tage hauptsächlich bei 22.5-30 % MPD. Mehrere der etwa 300 μm langen Einkristalle wiesen am Synchrotron (Beamline ID14-2, ESRF, Grenoble, Frankreich) eine gute Streukraft von bis zu 1.5 \AA auf, so dass hier ein 1.5 \AA Datensatz gesammelt werden konnte.

F: Durch Optimierung der Bedingung 0.2 M NaCitrat, 0.1 M Tris, pH 8.5, 30 % PEG 400 (NC, Lsg. 77) konnten von der FMN-rekonstituierten W38F Mutante in Gegenwart von 2 Äquivalenten CoA große Plättchen mit quadratischer Grundfläche erhalten werden. Da diese Kristalle auch am

Synchrotron (Beamline ID14-2, ESRF, Grenoble, Frankreich) nur eine mäßige Streukraft von etwa 2.5 Å aufwiesen, wurden sie für spektroskopische Messungen am Mikrospektralphotometer verwendet, wofür sie aufgrund der geringen Schichtdicke in einer Richtung hervorragend geeignet waren.

H: Optimierung der Bedingung 0.1 M Ammoniumsulfat; 0.05 M Cacodylat, pH 6.5; 15 % PEG 8000 (SB, Lsg. 15 1:1) lieferte nach einer Woche aus bereits präzipitierter Proteinlösung tieforange Einkristalle der FMN-rekonstituierten R45A-Mutante, die eine Länge von 400-500 µm aufwiesen. Durch Aufsetzen an der Drehanode konnte ein vollständiger Datensatz bis zu einer Auflösung von 2.58 Å gesammelt werden.

I: Große hexagonale Kristalle der FMN-rekonstituierten R65A-Mutante mit einer Kantenlänge von etwa 200 µm konnten bereits im Screen unter der Bedingung 0.4 M Ammoniumsulfat (NC, Lsg. 25) nach einem Monat erhalten werden. Ein vollständiger Datensatz bis zu einer Auflösung von 1.4 Å wurde am Synchrotron (Beamline BW7A, DESY, Hamburg) aufgenommen.

J: Unter der gleichen Bedingung wie unter I beschrieben konnten auch von der R65A-Mutante mit endogen gebundenen Kofaktoren große hexagonale Kristalle erhalten werden, deren Wachstum jedoch zwei Monate benötigte. Nach Aufnahme eines 2.0 Å Datensatzes an der Drehanode konnte auch ein 1.08 Å Datensatz am Synchrotron (Beamline X065A, SLS, Villigen, Schweiz) gesammelt werden.

Die Dokumentation der Kristalle erfolgte mit einer Power Shot A70 Digitalkamera (*Canon*) an einem Mikroskop (*Olympus*). Fotos der Kristalle aus Abbildungen H und I wurden am Dokumentationssystem CrystalPro HT 110 (*Molecular Dimensions Limited*) aufgenommen.

Interessanterweise scheint die FMN-Bindung keinen großen Einfluss auf die Kristallisationseigenschaften zu haben. Zwar kann beobachtet werden, dass sich die Bedingungen, unter denen sich die Kristalle ausbilden, im direkten Vergleich manchmal unterscheiden, doch ist die Anzahl der erhaltenen Kristalle bei den FMN-enthaltenden Ansätzen nicht höher bzw. die Verteilung nicht zugunsten optisch gut erscheinender Einkristalle im Vergleich zu Mikrokristallen oder Clustern verschoben.

Einen entscheidenden Effekt scheint der zweite endogen gebundene Kofaktor CoA zu besitzen, der in der Elektronendichte der hochaufgelösten Struktur der FMN-rekonstituierten R65A-Mutante zufällig entdeckt und schließlich auch proteinchemisch nachgewiesen werden konnte. Daraufhin durchgeführte Kokristallisationsversuche der FMN-rekonstituierten W38F-Mutante mit einem zweifachen CoA-Überschuss führten zu einer drastischen Verringerung des Auftretens minderwertigen kristallinen Materials. Die Optimierung der noch wenigen Kristalle liefernden Bedingungen (1-2 %) führte in allen Fällen zur Bildung nahezu perfekter Einkristalle von mittlerer bis sehr guter Streukraft und verringerter Mosaizität.

3.1.7.2 Datensammlung, Strukturlösung und Verfeinerung des *T. thermophilus* Dodecins

Datensätze des *T. thermophilus* Dodecins sowie seiner Mutanten wurden bei 100 K entweder an der hauseigenen Kupferdrehanode (Datensätze BM1a6a, BM27a3a, BM53c1) oder an den Synchrotron Beamlines BW7A des DORIS III Speicherrings am DESY in Hamburg (Datensätze BM11, BM22d1), der Beamline ID14-2 des ESRF in Grenoble (Frankreich) (Datensatz BM222) bzw. an Beamline X06SA der SLS des Paul-Scherrer-Instituts in Villigen

(Schweiz) (Datensätze BM13, BM31a2) aufgenommen. Insgesamt wurden 8 verschiedene Datensätze von 5 verschiedenen Mutanten gesammelt, die sich qualitativ sehr voneinander unterschieden: So konnte von einem Kristall der nicht-rekonstituierten W38Y-Mutante selbst am Synchrotron nur ein Datensatz bis zu einer Auflösung von 3.1 Å erhalten werden, während Kristalle der FMN-rekonstituierten W38F-Mutante (BM222) bis 1.5 Å, die Kristalle der R65A-Mutante sogar bis zu einer Auflösung von 1.4 bzw. 1.08 Å streuten. Weitere Details zur Datensammlung finden sich in Tab. 11.

Die anschließende Prozessierung der Messdaten, die mit den Programmen MOSFLM und SCALA [137] durchgeführt wurde – die Prozessierung der Daten, die am ESRF gesammelt wurden, erfolgte mit Hilfe des Programme XDS und XSCALE [138] – ergab insgesamt vier verschiedene Raumgruppen: Während das nicht-rekonstituierte *T. thermophilus* WT Dodecin (Datensatz BM1a6a) in der tetragonalen Raumgruppe $P4_12_12$ und das FMN-rekonstituierte WT Dodecin (Datensatz BM27a3a) und die FMN-rekonstituierten R45A- und W38F-Mutanten (BM53c1, BM222) in der orthorhombischen Raumgruppe 2_12_12 vorlagen, kristallisierten beide R65A-Mutanten (BM11, BM13) in der trigonalen Raumgruppe $P3_121$ und die nicht-rekonstituierten W38F- und W38Y-Mutanten (BM31a2, BM22d1) in der hexagonalen Raumgruppen $P6_3$. Aufgrund der erhaltenen Zellparameter wurden 1 bzw. 0.5 Dodecamere pro asymmetrische Einheit angenommen, die Solvensgehalte variierten zwischen 0.486 (nicht-rekonstituierter WT, BM1a6a) und 0.609 bzw. 0.637 (nicht-rekonstituierten W38F- und W38Y-Mutante, BM31a2 und BM22d1). Durch die stark variierenden Kristallqualitäten unterschieden sich die Kristalle erheblich in ihrer Mosaizität; diese betrug zwischen 0.33 bzw. 0.37 für die FMN-rekonstituierte W38F- bzw. R65A-Mutante (BM222, BM11) und 1.00 für den FMN-rekonstituierten Wildtyp. Für den atomar aufgelösten R65A-Datensatz wurde eine Mosaizität von nur 0.1 erhalten.

Die Strukturlösung des nicht-rekonstituierten *T. thermophilus* WT Dodecins erfolgte durch *molecular replacement* [139] unter Zuhilfenahme des Programms MOLREP [137] mit einem Trimer der bereits veröffentlichten Struktur des *H. salinarum* Dodecins (pdb-Eintrag: 1mog) [94], das eine Sequenzidentität von 34 % aufweist, als anfängliches Suchmodell. Für die Strukturlösung des FMN-rekonstituierten WT Dodecins sowie der Mutanten wurde dann je nach Raumgruppe ein Hexamer bzw. Dodecamer des nicht-rekonstituierten WT Dodecins als Suchmodell verwendet. Die Strukturen von Kristallen bereits bekannter Raumgruppen wurden durch *molecular substitution* erhalten.

Tab. 11: Datensammlung und Verfeinerungsstatistik der *T. thermophilus* Dodecine

Datensatz	BM1a6a	BM27a3a	BM53c1	BM11/r65anca4	BM13	BM22d1	BM31a2	BM222
<i>Datensammlung</i>								
<i>und -prozessierung</i>								
Röntgenquelle	FR591/CuK α	FR591/CuK α	FR591/CuK α	BW7A/DESY	X06SA/SLS	BW7A/DESY	X06SA/SLS	ID14-2 /ESRF
Detektor	Mar345	Mar345	Mar345	MARCCD	Pilatus 6M	MARCCD	MARCCD	ADSC Q4R
Temperatur	100 K	100 K	100 K	100 K	100 K	100 K	100 K	100 K
Wellenlänge [Å]	1.54179	1.54179	1.54179	0.9774	0.9	0.97600	0.97999	0.933
Raumgruppe	P4 ₁ 2 ₁ 2	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P3 ₁ 21	P3 ₁ 21	P6 ₃	P6 ₃	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Einheitszelle a,b,c [Å]	65.76, 65.76,	67.48, 98.04,	67.29, 68.49,	67.59, 67.59,	67.59, 67.59,	147.77, 147.77,	134.64, 134.64,	67.630, 98.550
	202.41	137.60	229.89	169.19	169.19	98.24	109.38	139.840
Auflösung [Å]	19.87-2.40	24.76-2.60	25-2.59	14.88-1.40	15.00-1.08	128.04-3.10	116.25-2.48	9.99-1.5
	(2.46-2.40)	(2.73-2.54)	(2.66-2.59)	(1.44-1.40)	(1.4-1.08)	(3.18-3.1)	(2.54-2.48)	(1.54-1.5)
Strukturfaktoramplituden F 	129703	60816	122382	373150	1266655	81603	200382	845218
 F nach merging	18248	22085	32742	87239	191039	21771	38869	178447
Mosaizität [°]	0.49	1.00	0.42	0.37	0.1	0.70	0.49	0.33
I/σ(I)¹, R_{merge}^{a,b}	23.3 (3.9),	19.0 (3.9),	13.2 (3.5),	19.7 (4.2),	14.2 (1.6),	13.5 (2.3),	16.8 (1.7),	6.7 (2.1),
	0.067 (0.362)	0.080 (0.242)	0.094 (0.242)	0.079 (0.300)	0.097 (0.778)	0.105 (0.512)	0.068 (0.544)	0.067 (0.368)
Vollständigkeit^a	0.998 (1.000)	0.760 (0.168)	0.959 (0.733)	0.980 (0.962)	0.992 (0.953)	0.998 (0.992)	0.962 (0.792)	97.4 (96.5)
Moleküle in der Einheitszelle	0.5	1	1	0.5	0.5	1	1	1
Lösungsmittelgehalt	0.487	0.506	0.580	0.502	0.504	0.637	0.609	0.52
<i>Verfeinerung</i>								
R-factor/ R-free^{a,c}	0.225, 0.262	0.220, 0.244	0.207, 0.234	0.170,0.193	0.148, 0.170	0.254, 0.334	0.243, 0.291	0.219, 0.250
	(0.277, 0.278)	(0.370, 0.388)	(0.336, 0.361)	(0.214, 0.228)	(0.277, 0.274)	(0.268, 0.466)	(0.347, 0.409)	(0.352, 0.380)
% data for R_{free}	5.9	5.1	3.1	1.8	1.8	3.5	3.0	4.9
r.m.s.d. Bindungslängen [Å],	0.008, 0.960	0.009, 1.277	0.009, 1.277	0.008, 1.427	0.012, 1.670	0.080, 5.347	0.042, 3.537	0.009, 1.423
-winkel (°)								
durchschnittlicher B-Factor [Å²]	64.3	52.0	52.0	12.9	10.4	51.10	54.2	18.34
Strukturfaktoramplituden	17102, 1076	20911, 1125	31678, 1018	85624, 1575	187391,3469	21006, 765	37670, 1178	138426,7159
(Arbeitsset, Testset)^a	(1218, 75)	(1129, 75)	(1407, 51)	(6090, 126)	(12677, 239)	(1566, 51)	(1161, 59)	(10008, 501)
Atome (Protein, Heteroatom, Wasser)	3181, 95, 13	6372, 804, 25	6336, 891, 36	3230, 498, 509				6403, 953, 532

^a Werte in Klammern entsprechen den Werten in der höchsten Auflösungsschale.

$$^b R_{merge} = \sum_{hkl} \sum_i |I_i(hkl) - \langle I(hkl) \rangle| \div \sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl).$$

$$^c R_{work} = \sum |F_{obs} - F_{calc}| \div \sum (F_{obs}).$$

Die weitere Verfeinerung der Strukturen erfolgte durch manuelles Einpassen der Struktur in die erhaltenen Elektronendichten nach Anpassung der jeweiligen *T. thermophilus* Dodecin Sequenz mit dem Programm coot [141], begleitet von wiederholten Zyklen mit Refmac5 [140] üblicherweise unter Verwendung von TLS *restrained refinement* und NCS-Operatoren. Nicht zu sehen waren in der Elektronendichte die Reste 1 und 70 (Die Startamino­säure Formylmethionin wurde nach der Translation abgespalten, wie durch ESI-MS nachgewiesen werden konnte), Rest 69 konnte meist nur in den hochaufgelösten Strukturen zugeordnet werden. Außerdem wurden FMN-Dimere entlang der zweizähligen Achsen sowie CoA-Trimere entlang der dreizähligen Achsen eingefügt und die Besetzungszahlen den B-Faktoren entsprechend angepasst. Abschließend wurden Solvenz- und Wassermoleküle in die Elektronendichte eingefügt. Durch mehrmalige zyklische Verfeinerung konnten auf diese Weise R-Faktoren bis 0.148 und freie R-Faktoren bis 0.170 (nicht-rekonstituierte R65A-Mutante, Datensatz BM13) erreicht werden. Die Strukturen der nicht-rekonstituierten W38F und W38Y-Mutaten (BM31a2 und BM22d1) wurden nur bis zu einem R-Faktor von 0.243 bzw. 0.254 und einem freien R-Faktor von 0.291 und 0.334 anverfeinert, da eine weitere Verfeinerung keine neuen Erkenntnisse bringen würde.

Beispielhaft ist in Abb. 34 die Kristallstruktur sowie die Kristallpackung der FMN-rekonstituierten *T. thermophilus* W38F-Mutante zu sehen.

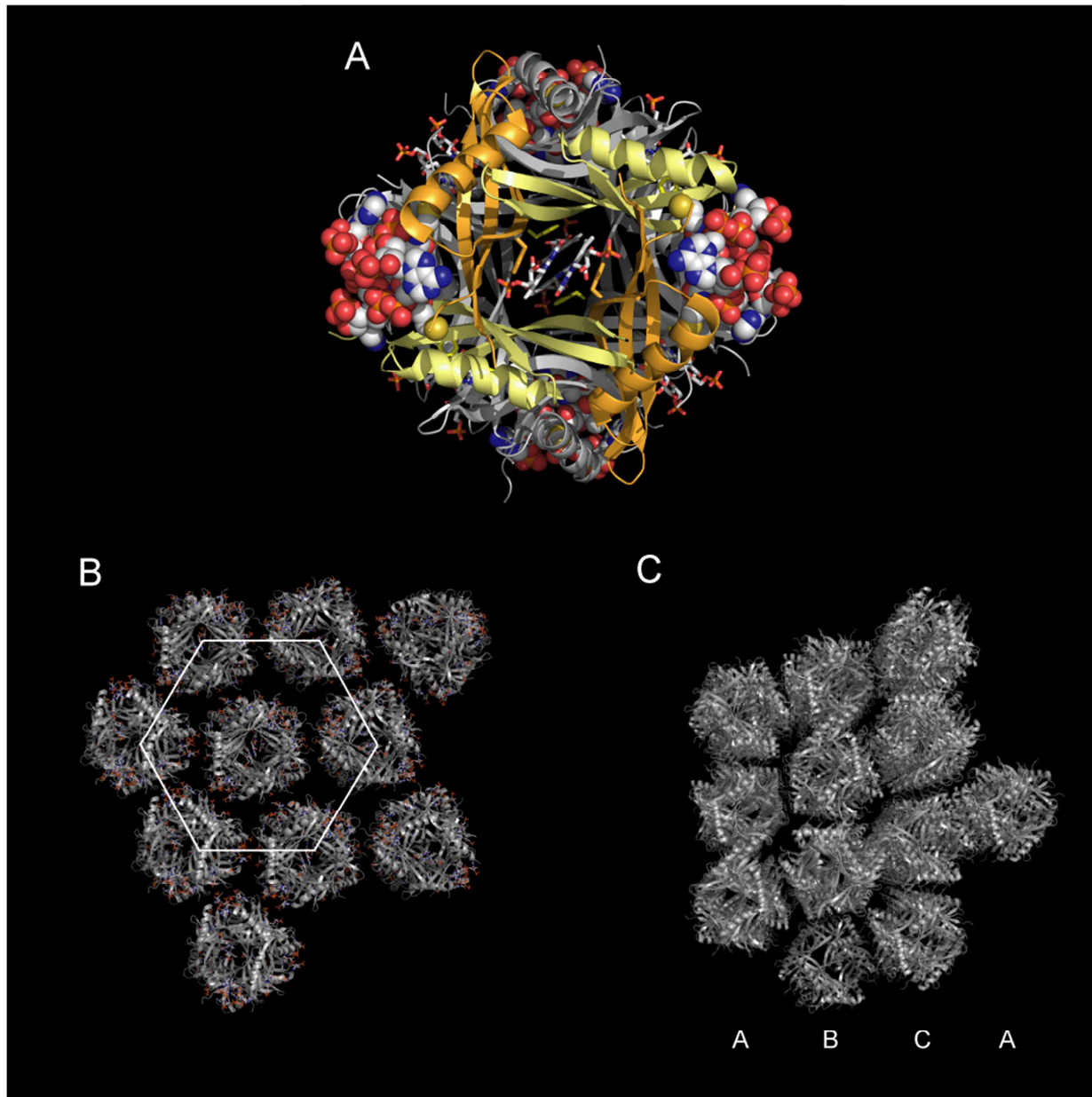


Abb. 34: Kristallstruktur der rekonstituierten *T. thermophilus* Dodecin W38F-Mutante (Datensatz BM222) bei einer Auflösung von 1.5 Å

A: Blick auf die zweizählige Achse des dodecameren Komplexes. Die Kofaktoren FMN und CoA sind als Stab- bzw. sphärisches Modell eingezeichnet. Eingezeichnet ist außerdem der Rest F38.

B: Die einzelnen Dodecamere bilden hexagonale Schichten aus.

C: Die hexagonalen Schichten lagern sich zu einer kubisch dichtesten Packung mit der Schichtenfolge ABCA zusammen.

Die Abbildung wurde mit PYMOL erstellt.

3.2 Charakterisierung des *Mycobacterium tuberculosis* Dodecins

3.2.1 Klonierung des *M. tuberculosis* Dodecingens

Die Klonierung des *M. tuberculosis* Dodecingens Rv1498a erfolgte bereits während der Diplomarbeit, jedoch enthielten alle im Rahmen der Diplomarbeit sequenzierten Klone Fehler in der Nucleotidsequenz des Inserts.

Das für das *M. tuberculosis* Dodecin codierende Gen wurde mittels PCR mit den Oligonucleotiden mtdode.up und mtdode.low1 unter Verwendung des Cosmids MTCY 277 als PCR-Template erneut amplifiziert und nach Restriktionsverdau mit BspHI und XhoI in den mit NcoI und XhoI geschnittenen pET-28a-Vektor ligiert. Um die Fehlerlosigkeit der Insertsequenz zu überprüfen, wurde eine doppelsträngige Sequenzierung mit den Primern pET.up und pet.T7-Term nach der Didesoxymethode durchgeführt. Erst nach der Sequenzierung drei verschiedener Klone wurde eine fehlerfreie Sequenz erhalten.

3.2.2 Expression und Aufreinigung des *M. tuberculosis* Dodecins

3.2.2.1 Expression des *M. tuberculosis* Dodecins

Um herauszufinden, unter welchen Bedingungen genügend lösliches Protein für die geplanten strukturellen und spektroskopischen Untersuchungen gebildet wird, wurden zunächst Testexpressionen durchgeführt. Die Testexpressionen erfolgten im 50 mL-Maßstab bei 37 °C und 225 rpm in LB- und TB-Medium, getestet wurde die Methode der Autoinduktion als auch die durch IPTG-Induktion. Jede Stunde nach Induktion mit 1 mM IPTG (Induktionskulturen) bzw. alle 2 h (Autoinduktionskulturen) wurden Proben für die SDS-PAGE entnommen und die optische Dichte bei 595 nm gemessen. Die induzierten Zellen wurden 5 h nach Induktion bei einer OD₅₉₅ von 3.2 (LB-Medium) bzw. 3.7 (TB-Medium) geerntet, die autoinduzierten nach 23 h bei einer OD₅₉₅ von 4.8 (LB-Medium) bzw. 9.0 (TB-Medium). Analyse der bei den Testexpression entnommenen Proben durch SDS-PAGE (hier nicht gezeigt) ergab, dass am meisten Dodecin in TB-Medium gebildet wird, zwischen Induktion und Autoinduktion jedoch kein großer Unterschied besteht.

Präparative Expressionen wurden daher in TB-Medium entweder durch Induktion mit 1 mM IPTG oder durch Autoinduktion bei 37 °C und 150 rpm im 5 L-Kolben mit einem Kulturvolumen von 2 L durchgeführt. Die induzierten Zellen wurden 4-5 h nach Induktion bei einer OD₅₉₅ von 2.5-3.0, die autoinduzierten nach 22-24 h bei einer OD₅₉₅ von 7.0-8.0 geerntet. Abb. 35 zeigt SDS-PAGE-Gele der Expression des *M. tuberculosis* Dodecins nach

Induktion (A) bzw. nach Autoinduktion (B) in TB-Medium. Neben der Monomerbande unterhalb der 14 kDa Markerbande ist hier bereits deutlich eine Oligomerbande bei etwa 45-50 kDa zu beobachten. Die geernteten Zellen wurden in AM-Puffer resuspendiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

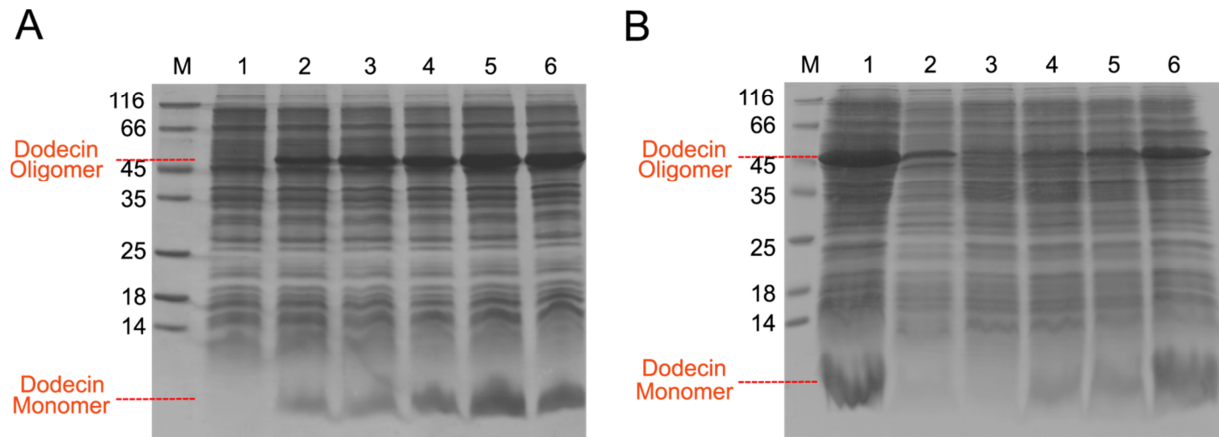


Abb. 35: 15 % SDS-PAGE-Gel der *M. tuberculosis* Dodecin Expression

A: Expression durch Induktion mit 1 mM IPTG. Bahn 1: 0 h nach Induktion; Bahn 2: 1 h nach Induktion; Bahn 3: 2 h nach Induktion; Bahn 4: 3 h nach Induktion; Bahn 5: 4 h nach Induktion, Bahn 6: 5 h nach Induktion, OD₅₉₅=1.8.

B: Expression durch Autoinduktion. Bahn 1: Übernachtskultur von BL21-Gold(DE3)/Mtdode-pET-28, OD₅₉₅=9.0; Bahn 2: 2 h nach Animpfen; Bahn 3: 4 h nach Animpfen; Bahn 4: 6 h nach Animpfen; Bahn 5: 8 h nach Animpfen; Bahn 6: 23 h nach Animpfen, OD₅₉₅=7.4.

3.2.2.2 Aufreinigung des *M. tuberculosis* Dodecins

Zur Überprüfung von Löslichkeit und Thermostabilität wurde ein Testaufschluss durch Ultraschall nach Inkubation der Zellen mit Lysozym durchgeführt. Es folgte eine Hitzefällung des löslichen Überstandes (10 min, 75 °C), die der Denaturierung löslicher *E. coli* Proteine dienen sollte.

Im präparativen Maßstab wurden die Zellen zunächst mittels French Press oder Homogenizer lysiert und der lösliche Überstand für 10 min bei 65-75 °C inkubiert. Nach dieser Hitzedenaturierung befand sich das *M. tuberculosis* Dodecin im löslichen Überstand und war bereits von einem Großteil der verunreinigenden Proteine befreit (Abb. 37 Bahn 3). Die Gesamtproteinmenge pro Liter Kulturmedium betrug etwa 100 (induzierte Probe) bis 500 mg (autoinduzierte Probe).

Da als nächster Aufreinigungsschritt eine Anionenaustauscherchromatographie folgte, wurde der Salzgehalt der Proteinlösung durch Dialyse oder durch Verdünnung gegen salzfreien

Puffer auf unter 50 mM NaCl gesenkt. Als Säulenmaterial wurde Q-Sepharose *high performance* gewählt. Die Elutions des Dodecins erfolgte bei etwa 200-400 mM NaCl, wie anhand des Chromatogramms und anschließender SDS-PAGE gezeigt werden konnte. Nach Vereinigung der Dodecin enthaltenden Fraktionen (Abb. 37, Bahn 4 zeigt eine SDS-PAGE-Probe der vereinigten Anionenaustauscherfraktionen) betrug die Proteinmenge etwa 50-100 mg pro Liter Kultur mit einem Protein:Kofaktor-Verhältnis von 15:1 (induziert) bzw. 24:1 (autoinduziert). Bemerkenswerterweise ist hier kein wesentlicher Unterschied im Flavingehalt zu beobachten, die induzierten Proben besitzen sogar wider Erwarten einen geringfügig höheren Flavingehalt als die autoinduzierten.

Als letzter Aufreinigungsschritt diente nach Aufkonzentrierung der Probe eine Gelfiltration mit Superdex 200 als Säulenmaterial. Das Chromatogramm zeigt im Wesentlichen einen Hauptpeak, dessen Elutionsvolumen dem apparenten Molekulargewicht eines Dodecamers entspricht (siehe Abb. 36 A). Die zu diesem Hauptpeak gehörigen Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE analysiert und die Fraktionen mit der höchsten Reinheit vereinigt. Eine SDS-PAGE-Probe dieses Pools ist in Abb. 37, Bahn 5 zu sehen. Insgesamt konnten hier etwa 31 mg/L Kultur mit einem Protein:Kofaktorverhältnis von 20:1 (autoinduzierte Probe, induzierte Probe n. b.) erhalten werden.

Zur Untersuchung der Flavinbindung wurde nach Analyse des im *M. tuberculosis* Dodecin gebundenen Flavinkofaktors durch HPLC-MS die Probe nach der Anionenaustauscherchromatographie im Konzentrator mit einem Überschuss FMN versetzt und das nicht gebundene Flavin durch Gelfiltration abgetrennt. Die Fraktionen unter dem zum Dodecamer gehörenden Hauptpeak wurden einer SDS-PAGE unterzogen und die Fraktionen mit der höchsten Reinheit vereinigt und aufkonzentriert. Insgesamt wurden etwa 24 mg pro Liter Kultur mit einem Protein-Kofaktorverhältnis von 0.9:1 erhalten; ein Gelfiltrationschromatogramm dieser Probe ist in Abb. 36 B zu sehen, eine SDS-PAGE-Probe in Abb. 37 Bahn 6.

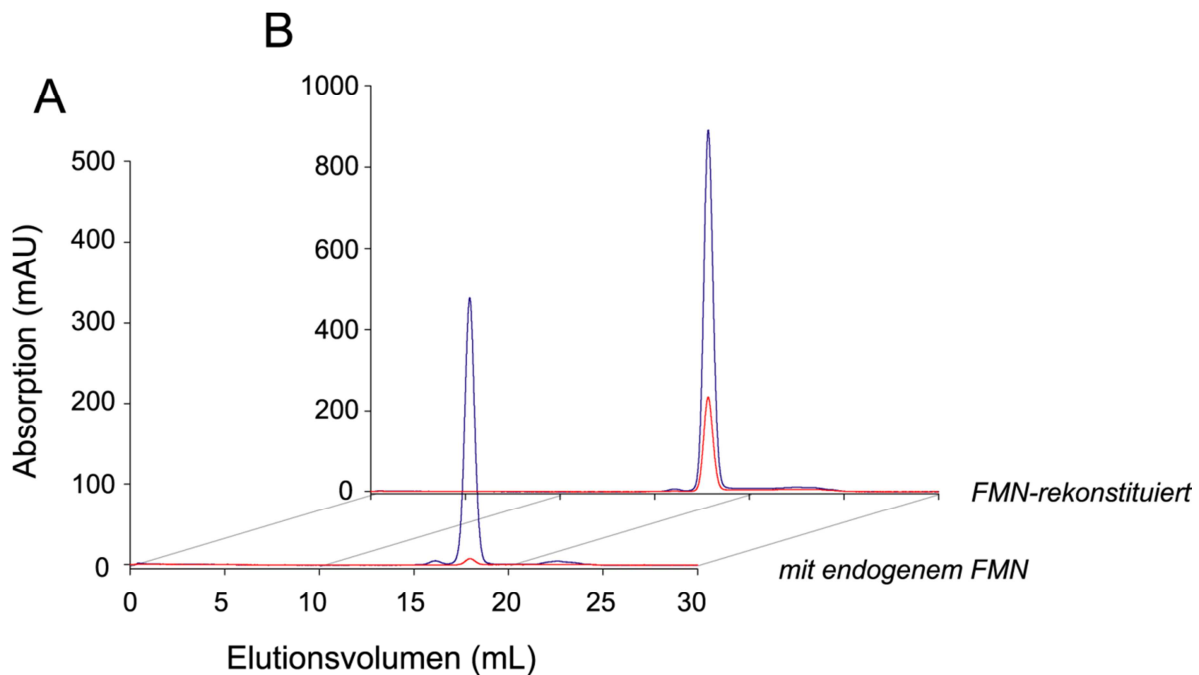


Abb. 36: Gelfiltrationschromatogramm des *M. tuberculosis* Dodecins

Die roten Kurven entsprechen der Absorption bei 450 nm, die blauen Kurven der Absorption bei 280 nm. Aufgetragen wurden jeweils 0.5 mL einer Konzentration von 1.5 mg/mL. Man beachte die unterschiedlichen Skalen der Ordinaten.

A: Chromatogramm des *M. tuberculosis* Dodecins mit endogen gebundenen Kofaktoren. Der Hauptpeak bei einem Elutionsvolumen von etwa 17.9 mL entspricht einem Molekulargewicht von 118 kDa und somit dem dodecameren Komplex. B: Chromatogramm des FMN-rekonstituierten *M. tuberculosis* Dodecins mit einem dem Dodecamer entsprechenden Hauptpeak bei einem Elutionsvolumen von 17.8 mL.

Zusammenfassung:

Das *M. tuberculosis* Dodecin konnte in *E. coli* BL21-Gold(DE3) in großen Mengen durch Induktion mit IPTG oder durch Autoinduktion überexprimiert werden (siehe Abb. 35 A und B, bzw. Abb. 37 Bahn 1). Nach Aufschluss durch French Press oder Homogenizer (Abb. 37 Bahn 2) wurde ein Großteil der *E. coli* Proteine durch Hitzedenaturierung für 10 min bei 65-75 °C abgetrennt (Abb. 37, Bahn 3). Die folgende Anionenaustauscherchromatographie diente hauptsächlich der Aufkonzentrierung der Probe sowie der Abtrennung anderer Zellbestandteile wie etwa DNA. Im letzten Schritt wurden einige größere Protein noch durch Gelfiltration abgetrennt (Abb. 37 Bahn 5) und das Protein mit FMN rekonstituiert (Abb. 37, Bahn 6). Schließlich wurden etwa 24 mg Protein pro Liter Kultur mit einer Reinheit > 90 % und mit einem Protein:Flavin-Verhältnis von 0.9:1 erhalten, was im Rahmen der Messgenauigkeit einem 1:1-Verhältnis entspricht.

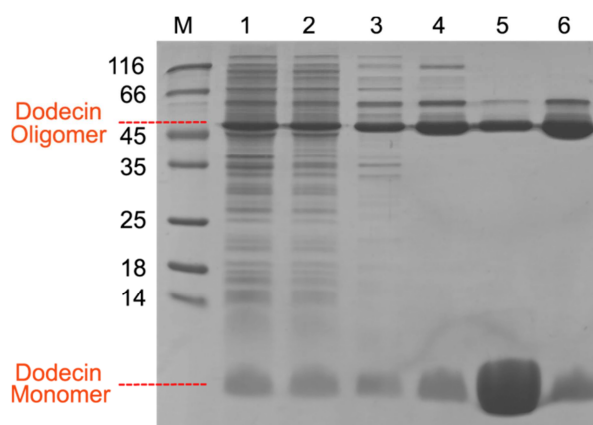


Abb. 37: 15 % SDS-PAGE-Gel der *M. tuberculosis* Dodecin Aufreinigung

Bahn 1: Zellextrakt von BL21-Gold(DE3)/Mtdode-pET-28 nach Induktion mit 1 mM IPTG. Bahn 2: Überstand nach Aufschluss; Bahn 3: Überstand nach Hitzefällung; Bahn 4: Probe nach Anionenaustauscherchromatographie; Bahn 5: Probe nach Gelfiltration (hier 12 µg aufgetragen); Bahn 6: FMN-rekonstituierte Probe nach Gelfiltration (hier 10 µg aufgetragen).

3.2.2.3 Bestimmung des Molekulargewichtes durch Massenspektrometrie

Das Molekulargewicht des aufgereinigten *M. tuberculosis* Dodecin Monomers wurde mittels HPLC-ESI-MS ermittelt. Ermittelte und berechnete Werte finden sich in Tab. 12.

Tab. 12: Vergleich ermittelter und berechneter Molekulargewichte des *M. tuberculosis* Dodecins

	ermittelt mit ESI-MS	berechnet	berechnet nach Abspaltung des Start-Formyl-Methionins
<i>M. tuberculosis</i> Dodecin	7496.4	7629.6	7498.4

Angegeben sind jeweils die M+1-Werte des Molekulargewichtes

Durch Bestimmung der Molekulargewichte der aufgereinigten Proteinproben konnten die erwarteten Molekulargewichte bestätigt und Mutationen innerhalb der Polypeptidkette ausgeschlossen werden. Außerdem zeigte das ermittelte Molekulargewicht die posttranslationale Abspaltung der Startamino­säure N-Formyl-Methionin. Die Abweichungen von zwei Dalton zwischen berechneten und gemessenen Massen sind vermutlich auf Ungenauigkeiten bei der Kalibrierung zurückzuführen, da Messungen die später von auf denselben Konstrukten beruhenden Proteinen durchgeführt wurden, Werte innerhalb der Spezifikation ergaben [148].

3.2.3 Kofaktorbindung und Oligomerisierung des dodecameren *M. tuberculosis* Dodecinkomplexes

3.2.3.1 Bestimmung des apparenten Molekulargewichtes durch Gelfiltration

Molekulargewicht und Oligomerisierungszustand des *M. tuberculosis* Dodecins unter nativen Bedingungen wurden in Zusammenarbeit mit Bodo Sander durch analytische Gelfiltration bestimmt. Hierzu wurde eine kalibrierte Superdex 10/300 GL verwendet. Für das *M. tuberculosis* Dodecin konnte auf diese Weise ein Elutionsvolumen von 17.9 mL ermittelt werden, das einem Molekulargewicht von 119 kDa und somit dem Dodecamer entspricht (siehe auch Abb. 36).

3.2.3.2 Bestimmung der endogen im *M. tuberculosis* Dodecin gebundenen Kofaktoren

Zur qualitativen Identifizierung der endogen im *M. tuberculosis* Dodecin gebundenen Kofaktoren wurden diese durch TCA-Fällung aus dem Protein extrahiert und mittels HPLC-ESI-MS untersucht. Hierdurch konnte die Anwesenheit von Riboflavin, FMN und CoA im oxidierten Zustand bestätigt werden (Massenspektrum zur Identifikation des CoAs siehe Anhang 6).

Eine quantitative Bestimmung des CoA-Gehaltes mittels des Ellman-Assays unter denaturierenden Bedingungen ergab negative Absorptionswerte, so dass CoA auf diese Weise weder quantitativ noch qualitativ detektiert werden konnte.

3.2.3.3 Bestimmung des Dodecin-gebundenen Flavin-Extinktionskoeffizienten

Da durch die Bindung des Flavins an das *M. tuberculosis* Dodecin eine Änderung des Extinktionskoeffizienten stattfindet, war eine Bestimmung dieses Dodecin-gebundenen Extinktionskoeffizienten notwendig, um Kofaktorkonzentrationen sowie Protein:FMN-Verhältnisse zuverlässig zu ermitteln. Diese Bestimmung wurde von Bodo Sander wie in seiner Diplomarbeit beschrieben [147] durchgeführt und lieferte für FMN einen Extinktionskoeffizienten von $10150 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

3.2.4 Spektroskopische Charakterisierung des *M. tuberculosis* Dodecin-Flavin-Komplexes

3.2.4.1 Absorptionsspektroskopie

Absorptionsspektren des FMN-rekonstituierten *M. tuberculosis* Dodecins weisen mit Maxima bei etwa 380 nm ($S_0 \rightarrow S_2$ -Übergang) und 450 nm ($S_0 \rightarrow S_1$ -Übergang) auf die Bindung eines oxidierten Flavins hin. Im Vergleich zu freiem FMN zeigen sich nur geringe Unterschiede: Neben der leicht bathochromen Verschiebung des $S_0 \rightarrow S_2$ -Übergang von 373 auf 383 nm fällt besonders die Absorption im langwelligen Bereich um 550 nm auf, die beim *T. thermophilus* Dodecin einem Grundzustands Charge-Transfer-Übergang zugeordnet wurde; das Absorptionsmaximum des $S_0 \rightarrow S_1$ -Übergangs ist dagegen kaum verschoben (FMN: 445 nm, *M. tuberculosis* Dodecin: 446 nm) und auch die für Dodecine typische Schulter im Bereich um 480-490 nm ist hier nicht vorhanden. Auch bei der Verwendung von Dodecinlösungen mit geringem FMN-Anteil zur Vermeidung der Anwesenheit freien FMNs tritt die Schulter nicht in Erscheinung.

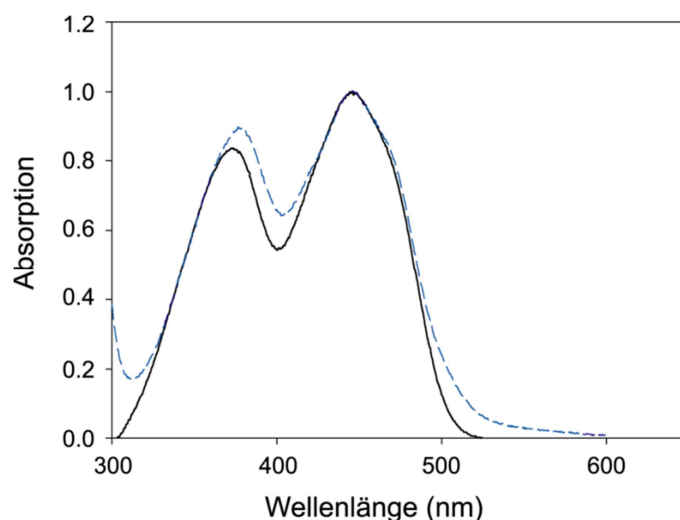


Abb. 38: Absorptionsspektrum des *M. tuberculosis* Dodecins

Absorptionsspektrum des *M. tuberculosis* Dodecins (blaue gestrichelte Linie) im Vergleich zu freiem FMN (schwarze Linie). Zum besseren Vergleich wurden die Maxima des $S_0 \rightarrow S_1$ -Übergangs auf 1 normiert.

3.2.4.2 CD-Spektroskopie

Zur Untersuchung der Thermostabilität des *M. tuberculosis* Dodecins wurden CD-Spektren bei 20 °C und 95 °C sowie Schmelzkurven von 20-95 °C im fernen UV-Bereich aufgenommen.

Das CD-Spektrum bei Raumtemperatur zeigt ein Spektrum eines aus α -Helices und β -Faltblättern bestehenden Proteins, das sich auch bei 95 °C nicht wesentlich ändert (siehe Abb. 39). Auch die bei 197 nm aufgenommenen Schmelzkurven weisen keinen sigmoidalen Kurvenverlauf auf (hier nicht gezeigt), so dass man auch hier – wie beim *T. thermophilus* Dodecin – nicht von einem Aufschmelzen der Sekundärstruktur sprechen kann.

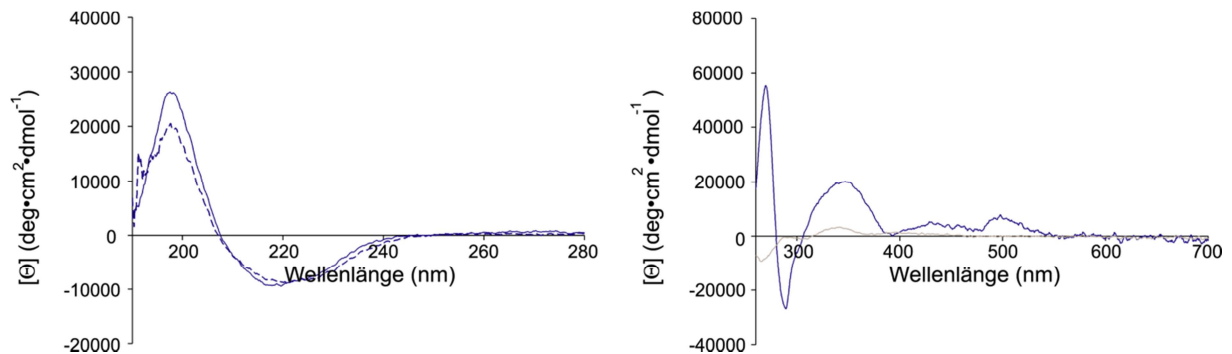


Abb. 39: CD-Spektrum des *M. tuberculosis* Dodecins

A: CD-Spektren des *M. tuberculosis* Dodecins bei 20 °C (durchgezogene Linie) und bei 95 °C (gestrichelte Linie) einer 10 μ M Dodecinlösung in 10 mM Tris/HCl, pH 8.0. Aufgetragen wurde die molare Elliptizität gegen die Wellenlänge.

B: CD UV-VIS-Spektrum einer Dodecinlösung mit stöchiometrisch gebundenem FMN (blaue Linie) sowie einer Lösung freien FMNs (graue Linie) in 10 mM Tris/HCl, pH 8.0.

Zur Charakterisierung der Dodecin:FMN-Bindung wurde ein UV-VIS CD-Spektrum des FMN-rekonstituierten *M. tuberculosis* Dodecins aufgenommen und mit dem Spektrum des freien Kofaktors FMN verglichen. Im Gegensatz zum freien FMN, das nahezu keine Extrema im UV-VIS Bereich aufweist, zeigt der Dodecin:FMN-Komplex ein deutliches Maximum bei 269 nm (auch andeutungsweise in Abb. 39 A sichtbar), das typisch für eine durch *stacking*-Interaktionen verstärkte Tryptophan-Absorption ist [149]. Auch die anderen beobachteten Extrema bei 289, 347, 428 sowie 497 nm geben einen deutlichen Hinweis auf die Interaktion zwischen Protein und Flavin-Kofaktor.

3.2.5 Strukturbestimmung des *M. tuberculosis* Dodecins

Wie beim *T. thermophilus* Dodecin wurden Kristallisationsexperimente zur Strukturbestimmung des aufgereinigten *M. tuberculosis* Dodecins durchgeführt. Neben der

Gesamtstruktur des *M. tuberculosis* Dodecins war die Bindung der Kofaktoren FMN und CoA von besonderer Bedeutung.

3.2.5.1 Kristallisation des *M. tuberculosis* Dodecins

Erste Versuche zur Kristallisation von FMN-rekonstituiertem Dodecin wurden nach der Dampfdiffusionsmethode im *hanging-drop*-Verfahren angesetzt. Auspipettiert wurden zwei verschiedene Proteinkonzentrationen jeweils mit und ohne Glycerin, als Kristallisationslösung wurde der Sigma Basic Screen verwendet. Die Tendenz zur spontanen Präzipitation, die bereits beim *T. thermophilus* Dodecin beobachtet wurde, machte sich auch bei der Kristallisation des *M. tuberculosis* Dodecins in etwa 40 % der Ansätze bemerkbar. Auffällig war hier jedoch das in etwa 15-20 % der Ansätze beobachtete Auftreten mikrokristallinen Materials in Form kleiner Oktaeder, wie in Abb. 40 A gezeigt, das in den Glycerin-enthaltenden Tropfen leicht reduziert ist. Eine neben den kleinen Oktaedern häufig beobachtete Kristallform tritt in Form kleiner Säulen (siehe Abb. 40 B) auf.

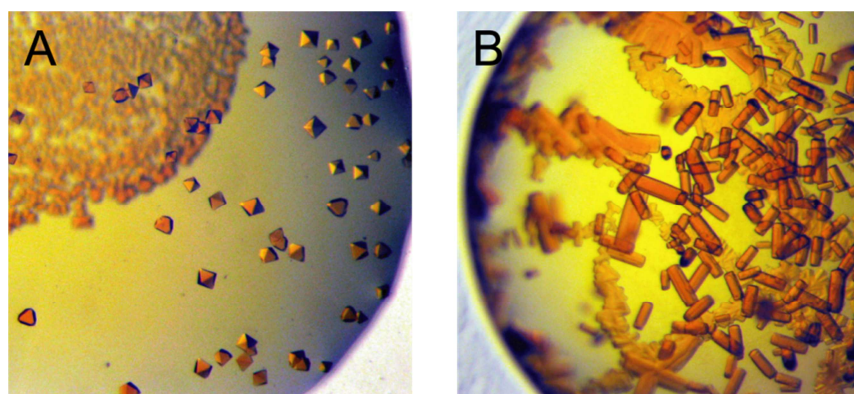


Abb. 40: Typische Kristallformen des FMN-rekonstituierten *M. tuberculosis* Dodecins

A: Kleine hexagonale Kristalle nach Optimierung der Bedingung 0.2 M $\text{Mg}(\text{OAc})_2$, 0.1 M Cacodylat, 30 % MPD (SB, Lsg. 21) wuchsen bereits nach wenigen Tagen in nahezu allen Tropfen bei 25 und 30 % MPD. Beim Testen der größeren Kristalle an der Drehanode und am Synchrotron (BW7A, DESY Hamburg) zeigte sich jedoch die nur geringe Streukraft. Die hier gezeigten kleinen hexagonalen Kristalle und Mikrokristalle treten bei 15-20 % der Kristallisationstropfen des FMN-rekonstituierten *M. tuberculosis* Dodecins auf.

B: Bei der Optimierung der Bedingung 0.2 M CaCl_2 , 0.1 M NaOAc, pH 4.6, 20 % Isopropanol (SB, Lsg. 24) wuchsen bereits nach wenigen Tagen über den gesamten pH- (4.2-4.8) und Fällungsmittelbereich (7.5-25 %) kleine säulenförmige Kristalle aus dem sofort nach dem Zusammenpipettieren entstandenen Präzipitat heraus. Auch diese Kristallform scheint typisch für das FMN-rekonstituierte *M. tuberculosis* Dodecin zu sein.

Die Dokumentation der Kristalle erfolgte mit einer Power Shot A70 Digitalkamera (Canon) am B061 Mikroskop (Olympus).

Da in diesem ersten Screen keine zur Datensammlung geeigneten Kristalle erhalten wurden, wurde ein zweiter Screen am Kristallisationsroboter im *sitting-drop*-Verfahren durchgeführt. Auspipettiert wurden das FMN-rekonstituierte Dodecin und das nicht-rekonstituierte Dodecin einer anderen Präparation in zwei verschiedenen Konzentrationen sowie in Anwesenheit von 5 % Glycerin. Neben dem Sigma Basic Screen wurden der Sigma Extension, der Sigma Cryo, der Nextal Classic und der Nextal Classic Lite Screen als Kristallisationslösungen verwendet. Hierbei zeigte sich, dass wie das *T. thermophilus* Dodecin auch das *M. tuberculosis* Dodecin leicht zur Ausbildung von Kristallen neigt. So konnten in 7-13 % der Bedingungen das Auftreten kristallinen Materials beobachtet werden, das hier jedoch wie schon zuvor beobachtet, hauptsächlich in Form kleiner Oktaeder vorlag. Größere Einkristalle waren dagegen nur in etwa 1 % der Ansätze vorhanden. Eine genauere Analyse der Zusammensetzung der Kristallisationslösungen ergab, dass die kleinen Oktaeder gehäuft in PEG-enthaltenden Lösungen auftraten, während die Fällungsmittel MPD oder Isopropanol meist zur Bildung von Nadeln bzw. Säulen führten.

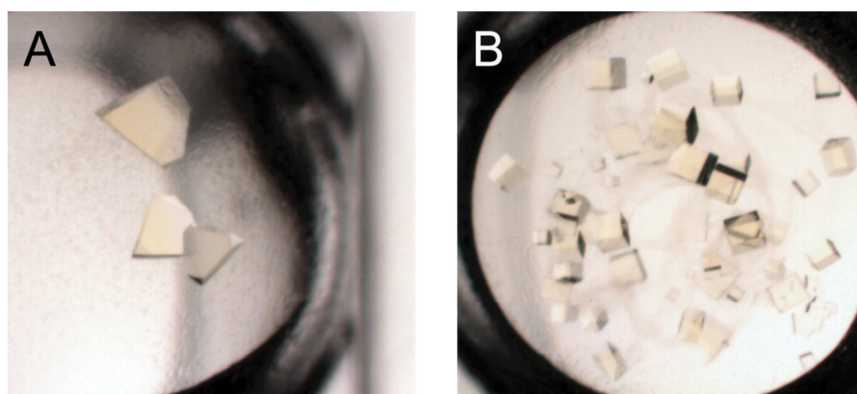


Abb. 41: Dokumentation erhaltener Kristallformen des *M. tuberculosis* Dodecins mit endogen gebundenen Kofaktoren

A: Große etwa 200 μm große Einkristalle konnten nach wenigen Wochen unter der Bedingung 0.1 M Tris, pH 8.5; 2 M Ammoniumdihydrogenphosphat (NC Lsg. 27) erhalten werden. Eine Optimierung dieser Bedingung lieferte Kristalle desselben Aussehens im pH-Bereich von 7.5-8.5 und dem Fällungsmittelbereich 1.2-2 M Ammoniumdihydrogenphosphat, die jedoch beim Testen sowohl an der Drehanode als auch am Synchrotron (BW7A, DESY Hamburg) nur geringe Streukraft ($>3.5 \text{ \AA}$) sowie eine hohe Mosaizität aufwiesen.

B: Große quaderförmige Kristalle mit einer Kantenlänge von 100-200 μm konnten bereits nach 1 Woche unter der Bedingung 0.05 M Cadmiumsulfat, 0.1 M HEPES, pH 7.5, 1 M NaOAc (NC Lsg. 39) erhalten werden. Bei der Optimierung dieser Bedingung wuchsen optisch besonders schöne Einkristalle mit einer Kantenlänge von bis zu 300 μm vor allem unter hohen Fällungsmittelkonzentrationen (0.9 M-1.1 M NaOAc) aus bräunlichem Präzipitat heraus. Eine Kristallisation des FMN-rekonstituierten Dodecins unter den gleichen Bedingungen konnte dagegen nicht beobachtet werden. Die erhaltenen Kristalle wurden sowohl an der Drehanode als auch am Synchrotron getestet (BW7A, DESY Hamburg), wiesen jedoch nur sehr geringe Streukraft ($\sim 7 \text{ \AA}$) auf. Kristalle ähnlichen Aussehens wurden auch bei einer Kokristallisation mit 1 und 2 Äquivalenten CoA erhalten, zeigten jedoch auch nur geringe Streuung.

Die Aufnahme der Kristallbilder erfolgte mittels eines CrystalPro HT 110 (TriTek Corporation) Dokumentatinsystems.

Wie beim *T. thermophilus* Dodecin war auch hier der Effekt von Ammoniumsulfat und NaOAc klar ersichtlich: Fast alle Ansätze, in denen Einkristalle beobachtet wurden, enthielten Ammoniumsulfat und/oder NaOAc entweder als Salz, Puffer oder Fällungsmittel. Während Ammoniumsulfat jedoch auch als alleiniges Fällungsmittel dienen konnte, war bei NaOAc meist ein zusätzliches Fällungsmittel notwendig.

Eine deutliche Verringerung der Ausbildung kristallinen Materials konnte durch Co-kristallisation mit CoA erreicht werden, das als zweiter endogen gebundener Kofaktor in der Elektronendichte der R65A-Mutante des *T. thermophilus* Dodein entdeckt und durch Massenspektrometrie auch im *M. tuberculosis* Dodecin nachgewiesen werden konnte. So enthielten CoA-enthaltende Ansätze nur noch 5 % kristallines Material, wobei der Anteil an Einkristallen 1 % betrug. Zur Durchführung des Screenings wurden hier FMN-rekonstituiertes Protein in zwei verschiedenen Konzentrationen sowie eine Proteinlösung mit 5 % Glycerin vom Roboter auspipettiert. Als Kristallisationslösungen wurden der Nextal Classic, der Nextal Classic Lite sowie der Nextal Anions Screen verwendet. Die Optimierung der erhaltenen Kristalle (siehe Abb. 42) lieferte große Einkristalle in den CoA-enthaltenden Ansätzen (siehe Abb. 42 A,C,E). Die Bildung von Nadeln und Säulen hingegen konnte in Tropfen ohne CoA beobachtet werden (siehe Abb. 42 B und D), die parallel unter exakt den gleichen Bedingungen auspipettiert wurden, um den Effekt von CoA auf die Kristallisationseigenschaften näher zu untersuchen.

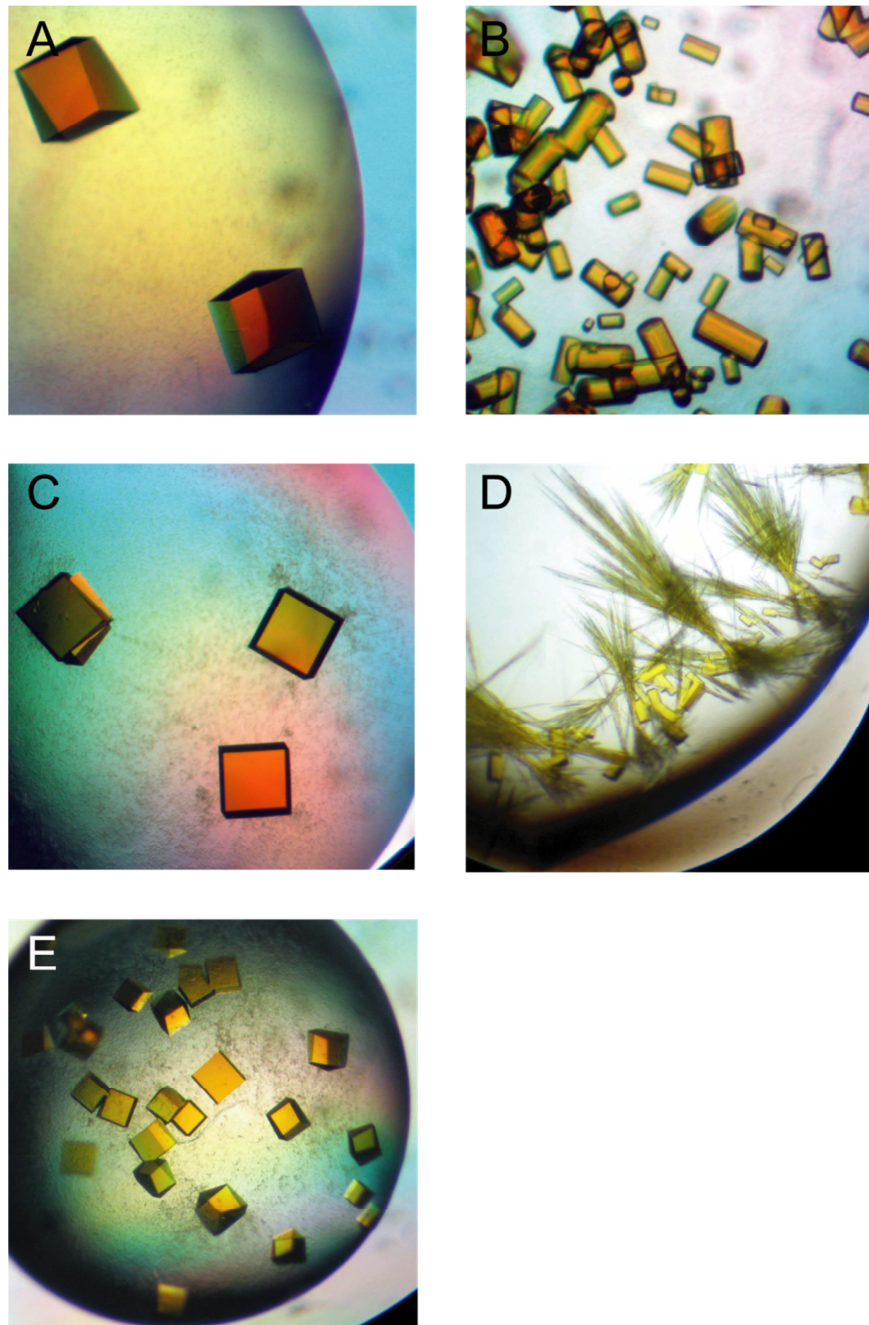


Abb. 42: Kokristallisation des *M. tuberculosis* Dodecins mit CoA

Abbildungen A, C und E zeigen jeweils die durch Kokristallisation mit CoA erhaltenen Kristalle des FMN-rekonstituierten *M. tuberculosis* Dodecins; in Abbildung B und D sind Kristalle zu sehen, die unter analogen Bedingungen ohne Zugabe von CoA erhalten wurden.

A: Große beinahe würfelförmige Kristalle einer Kantenlänge von etwa 400 μm wuchsen bereits nach einem Tag durch Optimierung der Bedingung 0.1 M NaOAc, pH 4.6; 0.3 M NaF (NA, Lsg. 5) vor allem bei pH 4.6-5.0 über den gesamten Fällungsmittelbereich von 0.2-0.45 M NaF. Von diesen Kristallen konnte am Synchrotron (Beamline ID14-2, ESRF, Grenoble, Frankreich) ein vollständiger Datensatz mit einer Auflösung bis zu 2.0 \AA gesammelt werden.

B: Ohne Zugabe von CoA kristallisierte das *M. tuberculosis* Dodecin in Form kleiner Säulen mit einer Kantenlänge von etwa 100 μm .

C: Durch Optimierung der Bedingung 0.01 M CoCl_2 , 0.1 M NaOAc, pH 4.6; 0.5 M 1,6-Hexandiol (NCL, Lsg. 1) konnten große würfelförmige Kristalle einer Kantenlänge von etwa 400 μm bereits nach einem Tag bei pH 4.6-5.0 über den ganzen Fällungsmittelbereich von 0.2-0.7 M Hexandiol erhalten werden. Die Kristalle wurden am Synchrotron getestet (Beamline BW7A, DESY, Hamburg), und ein vollständiger Datensatz bis zu einer Auflösung von 1.7 \AA konnte aufgenommen werden.

D: Kleine säulenförmige Kristalle wuchsen nach einigen Tagen in der sofort präzipitierten Proteinlösung, wenn das *M. tuberculosis* Dodecin ohne Zugabe von CoA unter analoger Bedingung wie unter C beschrieben kristallisiert wurde.

E: Die Optimierung der Bedingung 0.02 M CaCl₂, 0.1 M NaOAc, pH 4.6; 15 % MPD (NCL, Lsg. 15) lieferte Kristalle einer Kantenlänge von etwa 200-300 µm. Die Bildung dieser optisch nahezu perfekt erscheinenden Kristalle konnte bereits nach wenigen Tagen vor allem bei geringen Fällungsmittelkonzentrationen (10-15 % MPD) und pH 4.6-5.0 beobachtet werden. Ein vollständiger Datensatz wurde bis zu einer Auflösung von 1.95 Å am Synchrotron (Beamline ID23-2, ESRF, Grenoble, Frankreich) aufgenommen.

Die Dokumentation dieser Kristalle erfolgte mit einer PowerShot A70 (Canon) Digitalkamera an einem MZ8 (Leica) Mikroskop.

3.2.5.2 Datensammlung, Strukturlösung und Verfeinerung des *M. tuberculosis* Dodecins

Datensätze dreier – unter unterschiedlichen Bedingungen gewachsene – Kristalle des *M. tuberculosis* Dodecins (zu den jeweiligen Kristallisationsbedingungen siehe Anhang 8) konnten an der EMBL-Beamline BW7A des DORIS Speicherrings am DESY in Hamburg, sowie der Beamlines ID 14-2 und ID 23-2 des ESRF in Grenoble (Frankreich) aufgenommen werden. Die Datensammlung erfolgte jeweils bei einer Temperatur von 100 K und einer Wellenlänge der verwendete Synchrotronstrahlung von 0.9140, 0.933 bzw. 0.873 Å. Weitere Details zur Datensammlung sowie zur Prozessierung, Strukturlösung und Verfeinerung finden sich in Tab. 13.

Vollständige Datensätze von gefrorenen Einkristallen wurden bis zu einer Auflösung von 1.7 bzw. 2.0 und 1.95 Å gesammelt und die Daten anschließend mit MOSFLM und SCALA [137] bzw. XDS und XSCALE [138] prozessiert. Die Mosaizität des Datensatzes BM102 lag bei 0.3°; die erhaltenen Zellparameter des Datensatzes BM102 betrugen a=94.302, b=94.302, c=230.907; α=90; β=90; γ=120, die Zellparameter der Datensätze BM212 und BM209 zeigten nur äußerst geringe Abweichungen. Anhand der mit MOLREP [137] berechneten Selbstrotationsfunktion wurde den Kristallen die rhomboedrische Raumgruppe H32 zugeordnet (siehe Abb. 43). Aufgrund der Zellparameter und der Raumgruppe ergeben sich vier Dodecinmonomere pro asymmetrische Einheitszelle.

Die Strukturlösung des Datensatzes BM102 erfolgte durch *molecular replacement* [139] mit der 49 % Sequenzidentität aufweisenden Struktur des *T. thermophilus* Dodecins (Datensatz BM1a6a, pdb-Eintrag 2v21) als Suchmodell (4 Moleküle aus Dodecamer). Die auf diese Weise erhaltene Lösung lieferte einen anfänglichen R-Faktor von 0.473 und einen Korrelationsfaktor von 0.476 %. Die Strukturlösung der Datensätze BM212 und BM209 erfolgte durch *molecular substitution*.

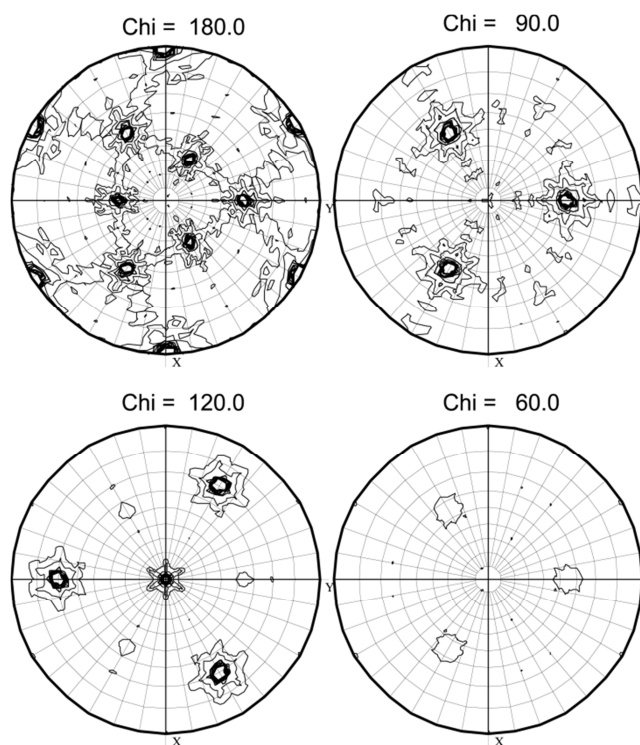


Abb. 43: Selbstrotationsfunktion eines *M. tuberculosis* Dodecin Datensatzes für die Winkel $\chi=180^\circ$, $\chi=90^\circ$, $\chi=120^\circ$ und $\chi=60^\circ$ berechnet mit den Daten von 2.5 bis 14.9 Å. Für die Berechnung wurde das Programm MOLREP verwendet.

Nach Anpassung der Sequenz wurde die weitere Verfeinerung durch manuelles Einpassen der Struktur in die vorhandene Elektronendichte mit dem Programm Coot [141], begleitet von wiederholten Verfeinerungszyklen mit Refmac 5 [137] unter Verwendung von TLS *restrained refinement* und NCS-Operatoren vorgenommen. Nicht zu sehen waren in der Elektronendichte die C-terminalen Reste 69. Außerdem wurden FMN-Dimere entlang der zweizähligen Achsen mit einer Besetzungszahl von 0.75 eingeführt. In die vorhandene Elektronendichte in der Bindungstasche entlang der dreizähligen Achsen wurden Adeninreste eingefügt; für den Riboseanteil und den Phosphopantetheinarm konnte jedoch keine zusammenhängende Elektronendichte beobachtet werden. Letztendlich wurden in noch vorhandene Reste elektronendichte Solvens- (Chlorid, Glycerin und Tris) sowie Wassermoleküle eingefügt. Auf diese Weise konnte ein R-Faktor von 0.172 und ein freier R-Faktor von 0.197 für die Daten des bis 1.7 Å streuenden Dodecin:FMN-Komplex-Kristall BM102 erhalten werden. Die Datensätze BM212 und BM209 wurden nur bis zu einem R-faktor von 0.232 bzw. 0.209 und einem freien R-Faktor von 0.253 bzw. 0.232 bei Auflösungen von 1.95 und 2.0 Å anverfeinert.

Tab. 13: Datensammlung und Verfeinerungsstatistik des *M. tuberculosis* Dodecins

Datensatz	BM102	BM212	BM209
Datensammlung und -Prozessierung			
Röntgenquelle	BW7A, DESY	ID14-2 (ESRF)	ID 23-2 (ESRF)
Wellenlänge [Å]	0.91840	0.933	0.873
Detektor	MAR CCD M300	ADSC Q4R	ADSC Q315R
Temperatur [K]	100	100	100
Raumgruppe	H32	H32	H32
Moleküle in der Einheitszelle	4	4	4
Zelldimensionen			
<i>a</i>, <i>b</i>, <i>c</i> [Å]	94.30, 94.30, 230.91	94.39, 94.39, 230.74	94.60, 94.60, 230.780
α, β, γ [°]	90.00, 90.00, 120.00	90.00, 90.00, 120.00	90.00, 90.00, 120.00
Auflösung [Å]^a	14.91-1.70 (1.79-1.70)	14.9-2.0 (2.05-2.0)	47.2-1.95 (2.00-1.95)
Strukturfaktoramplituden F 	486357	192409	159726
 F nach <i>merging</i>	43832	26678	29318
Multiplizität^a	11.1 (11.1)	7.2	5.4
R_{merge}^{a, b}	0.052 (0.775)	0.058 (0.320)	0.054 (0.580)
Vollständigkeit [%]^a	99.9 (100.0)	99.0 (98.1)	99.8 (99.9)
<I>/σ<I>^a	24.8 (3.3)	19.8 (6.7)	21.1 (3.2)
Mosaizität [°]	0.30	-	-
Wilson <i>B</i>-factor [Å²]	26.7	-	-
Lösungsmittelgehalt	0.614	0.627	0.629
Verfeinerungsstatistiken			
R_{work}, R_{free} [%]^{a, c}	17.2, 19.7 (19.6, 22.1)	23.2, 25.3 (-, 26.7)	20.9, 23.2 (29.1, 40.0)
% für R_{free}	2.5	2.3	2.4
Strukturfaktoramplituden (Arbeitsset, Testset)^{a, c}	42659, 1084 (3104, 73)	26056, 629 (1876, -)	28610, 698 (2071, 69)
R.m.s.d Bindungslängen [Å]	0.012	0.020	0.027
R.m.s.d Bindungswinkel [°]	1.342	2.118	2.018
Anzahl der Atome (Insgesamt; Protein, Hetero, Wasser)	2670; 2181, 228, 261	2422; 2199, 223,-	2341; 2182, 36, 123
Durchschnittlicher <i>B</i>-Faktor	28.0	32.5	25.9

^a Werte in Klammern entsprechen den Werten in der höchsten Auflösungsschale.

$$^b R_{\text{merge}} = \sum_{hkl} \sum_i |I_i(hkl) - \langle I(hkl) \rangle| \div \sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl).$$

$$^c R_{\text{work}} = \sum |F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}| \div \sum (F_{\text{obs}}).$$

Abb. 44 zeigt die 1.7 Å Kristallstruktur des *M. tuberculosis* Dodecins. Wie das *T. thermophilus* Dodecin weist auch das *M. tuberculosis* Dodecin eine dodecamere Struktur mit gebundenen FMN-Dimeren auf. Für die CoA-Trimere lässt sich jedoch keine zusammenhängende Elektronendichte beobachten.

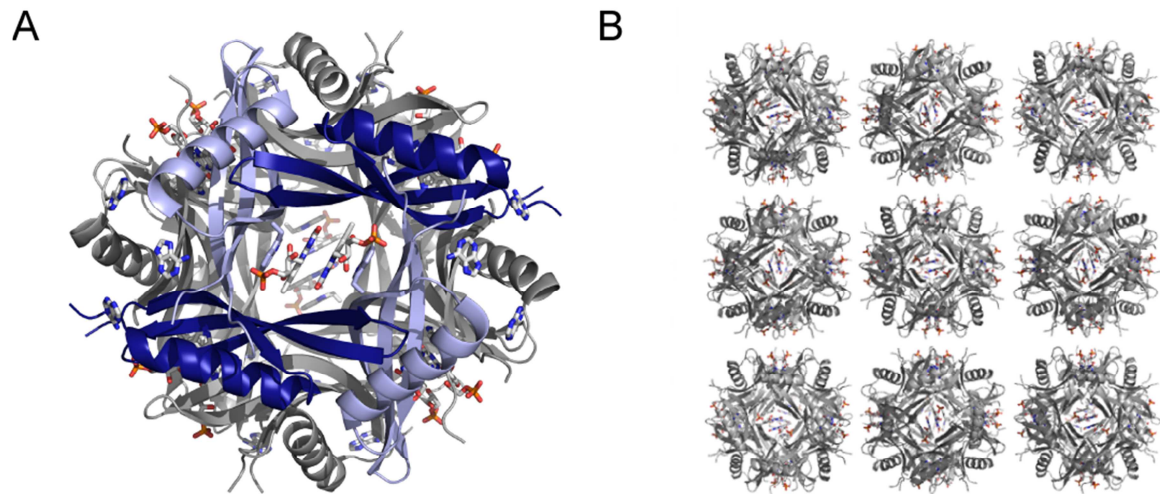


Abb. 44: 1.7 Å Kristallstruktur des *M. tuberculosis* Dodecins

A: Blick entlang der zweizähligen Achse auf die dodecamere Quartärstruktur des *M. tuberculosis* Dodecins. FMN-Dimere und Adeninmoleküle sind als Stabmodelle eingezeichnet.

B: Anordnung der Dodecamere im Kristall.

3.3 Charakterisierung des *Streptomyces coelicolor* Dodecins

3.3.1 Klonierung des *S. coelicolor* Dodecingens

Unter Verwendung der Primer Scdode.up und Scdode.down wurde aus genomischer DNA von *Streptomyces coelicolor* Stamm A3(2) ein PCR-Amplifikat des Gens *SCM10.06* der erwarteten Länge von 231 bp erhalten. Diese PCR diente neben der Amplifizierung auch dazu, Schnittstellen in das Insert einzuführen. Nach Gelextraktion des Amplifikats und Restriktionsverdau mit PciI und XhoI wurde es nach Hitzeinaktivierung und Aufreinigung in einen pET-28a Vektor ligiert. Dieser wurde zuvor mit NcoI und XhoI geschnitten, dephosphoryliert und nach Hitzeinaktivierung der verwendeten Enzyme aus einem Agarosegel extrahiert. Nach der Transformation in *E. coli* DH5 α erfolgte das Herstellen einer Flüssigkultur ausgehend von einer Einzelkolonie. Nach einer Plasmidpräparation wurde ein analytischer Restriktionsverdau mit FspI durchgeführt, um das Vorhandensein des gewünschten Inserts zu überprüfen. Erwartet wurde das Auftreten eines 2009 bzw. eines 3440 bp-Fragments.

Nach Überprüfung der Insertsequenz mit Hilfe der Sequenzierungsprimer T7 und pET-RP wurde von der Fa. GATC eine doppelsträngige Sequenzierung zweier Klone mittels der Didesoxymethode durchgeführt. Da beide Klone eine fehlerlose Sequenz aufwiesen, wurden die Plasmide in den chemisch kompetenten Expressionsstamm *E. coli* BL21-Gold(DE3) transformiert und als Glycerinstock bei -80 °C gelagert.

3.3.2 Testexpression und Löslichkeitsverhalten des *S. coelicolor* Dodecins

Um zu untersuchen, unter welchen Bedingungen lösliches Protein in hinreichender Menge für die Proteinkristallisation und andere biophysikalische Untersuchungen gebildet wird, wurden zunächst Testexpressionen in LB- und TB-Medium unter Induktions- und Autoinduktionsbedingungen durchgeführt. Durch Induktion mit 1 mM IPTG konnten nach 4 h optische Dichten bis 1.9 (sowie in LB-Medium als auch in TB-Medium) erreicht werden. Deutlich höhere Zelldichten wurden jedoch durch Autoinduktion erhalten: In LB-Medium wurden nach 24 h optische Dichten von 5.3, in TB-Medium sogar von 17.6 erhalten. Die Analyse der Proben mittels SDS-PAGE zeigte, dass trotz der relativ geringen Zelldichten in beiden Induktionsproben große Mengen des gewünschten Proteins enthalten waren. Außerdem konnte die Bildung großer Proteinmengen durch Autoinduktion in TB mittels SDS-PAGE nachgewiesen werden (Abb. 45), während das SDS-PAGE-Gel der

Testexpression in LB-Medium nur geringe Produktion des gewünschten Proteins aufwies (hier nicht gezeigt). Ursache für die geringe Bildung des gewünschten Proteins durch Autoinduktion in LB-Medium ist vermutlich eine falsche Zusammensetzung des Mediums. Bereits früher konnte gezeigt werden, dass Autoinduktion sehr stark von der chargenspezifischen Medienzusammensetzung abhängt.

Zur Überprüfung der Löslichkeit und der Thermostabilität des *S. coelicolor* Dodecins wurde ein Testaufschluss durch Ultraschall nach Inkubation mit Lysozym gefolgt von einer Hitzefällung des löslichen Überstandes (10 min, 65 °C) durchgeführt. Die Analyse durch SDS-PAGE ergab, dass in allen Fällen lösliches Protein gebildet wurde, das auch nach Inkubation bei 65 °C nicht zu der Bildung unlöslicher Aggregate führte. Bedingt durch die hohe Expressionsrate wurde am meisten lösliches Protein nach Aufschluss der Autoinduktionsproben in TB-Medium erhalten, so dass diese Methode die geeignetste schien, große Mengen an löslichem *S. coelicolor* Dodecin zu produzieren. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde das *S. coelicolor* Dodecin durch die Autoinduktion in TB-Medium rekombinant überproduziert.

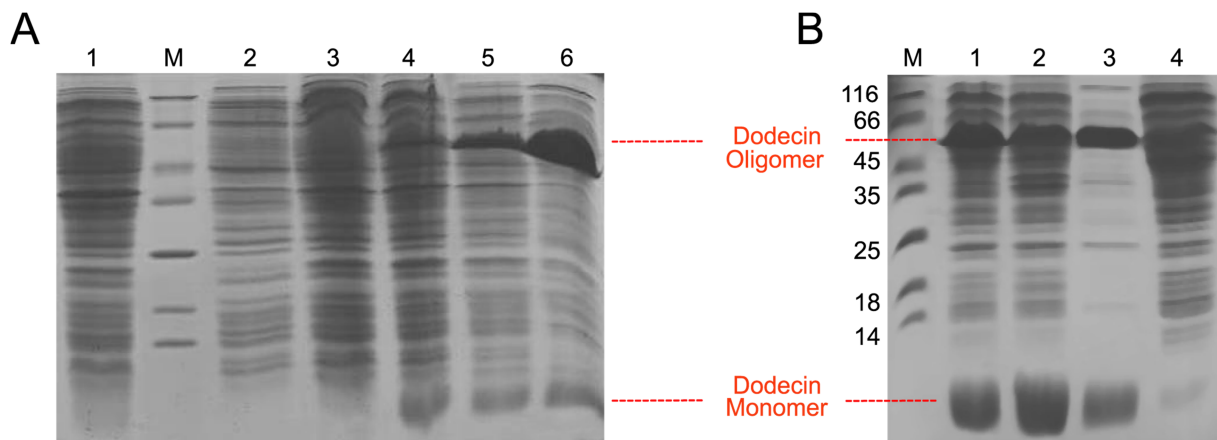


Abb. 45: 15 % SDS-PAGE-Gele der Testexpression und des Löslichkeitstest des *S. coelicolor* Dodecins

A: Testexpression des *S. coelicolor* Dodecins in TB durch Autoinduktion. Bahn 1: Übernachtskultur von BL21-Gold(DE3)/Scdode-pET28, OD₅₉₅=2.6; Bahn 2: 2 h nach Animpfen; Bahn 3: 4 h nach Animpfen; Bahn 4: 6 h nach Animpfen; Bahn 5: 8 h nach Animpfen; Bahn 6: 24 h nach Animpfen, OD₅₉₅=17.6. Aufgetragen wurden jeweils 10 µL einer Zellsuspension des Bakterienpellets aus 1 mL Kultur in 100 µL Extraktionsmedium. B: Löslichkeitstest und Hitzefällung nach Autoinduktion in TB-Medium. Bahn 1: Überstand nach Aufschluss; Bahn 2: Pellet nach Aufschluss; Bahn 3: Überstand nach Hitzefällung; Bahn 4: Pellet nach Hitzefällung.

Die weitere Charakterisierung des *S. coelicolor* Dodecins wurde von Bodo Sander durchgeführt [147].

3.4 Charakterisierung des *Pseudomonas aeruginosa* Dodecins

3.4.1 Klonierung des *P. aeruginosa* Dodecingens

Mit den Primern Padode.up und Padode.down wurde aus genomischer DNA von *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 ein PCR-Produkt des Gens PA0038 der erwarteten Länge von 231 bp erhalten, das – wie für das *S. coelicolor* Dodecingen beschrieben – in den Vektor pET28a kloniert wurde. Das Vorhandensein des entsprechenden Inserts wurde durch einen analytischen Restriktionsverdau mit BglI kontrolliert. Erwartet wurde das Auftreten eines 1976 und eines 3473 bp-Fragments.

Mit Hilfe der Sequenzierungsprimer T7 und pET-RP und doppelsträngiger Sequenzierung mittels der Didesoxymethode (durchgeführt von der Fa. GATC) wurden drei Klone auf Fehlerlosigkeit überprüft. Die Sequenzierung zeigte, dass nur ein Klon das gewünschte Insert enthielt (einer wies eine Transition auf, ein zweiter einen Frameshift). Das Plasmid mit der richtigen Insertsequenz wurde in den chemisch kompetenten *E. coli* Stamm BL21-Gold(DE3) transformiert und als Glycerinstock bei -80 °C gelagert.

3.4.2 Testexpressionen und Löslichkeitstests des *P. aeruginosa* Dodecins

Zur Kontrolle der geeigneten Expressionsbedingung zur Produktion großer Mengen löslichen Proteins wurden zunächst Testexpressionen unter Induktions- und Autoinduktionsbedingungen sowohl in LB- als auch in TB-Medium durchgeführt. Durch Induktion mit 1 mM IPTG wurden nach 4 h OD₅₉₅-Werte von 3.1 (LB-Medium) bzw. 3.3 (TB-Medium) erhalten. Autoinduktion lieferte nach 24 h Zelldichten von OD₅₉₅=5.4 in LB-Medium bzw. 20.0 in TB-Medium. Die Analyse der Proben mittels SDS-PAGE zeigte die Produktion großer Mengen Protein unter nahezu allen getesteten Bedingungen mit Ausnahme der Autoinduktion in LB-Medium. Auch hier schien wieder eine falsche Chargenzusammensetzung die Ursache für die geringe Expressionsrate zu sein. Aufgrund der hohen Zelldichte wurde durch Autoinduktion in TB-Medium am meisten Protein gebildet (s. Abb. 46).

Im Anschluss an die Testexpressionen wurden Löslichkeitstests mittels Ultraschallaufschluss nach Lysozyminkubation zur Analyse des Löslichkeitsverhaltens gefolgt von einer Hitzefällung zur Untersuchung der Thermostabilität durchgeführt. Die Analyse der Proben mittels SDS-PAGE zeigte, dass unter allen getesteten Bedingungen lösliches Protein gebildet wurde, das auch nach 10-minütiger Inkubation bei 65 °C nicht zur Aggregation neigt (Abb.

46). Da aufgrund der hohen Zelldichten durch Autoinduktion in TB-Medium am meisten lösliches Protein gebildet wurde, wurde diese Methode zur Expression des *P. aeruginosa* Dodecins in präparativem Maßstab gewählt.

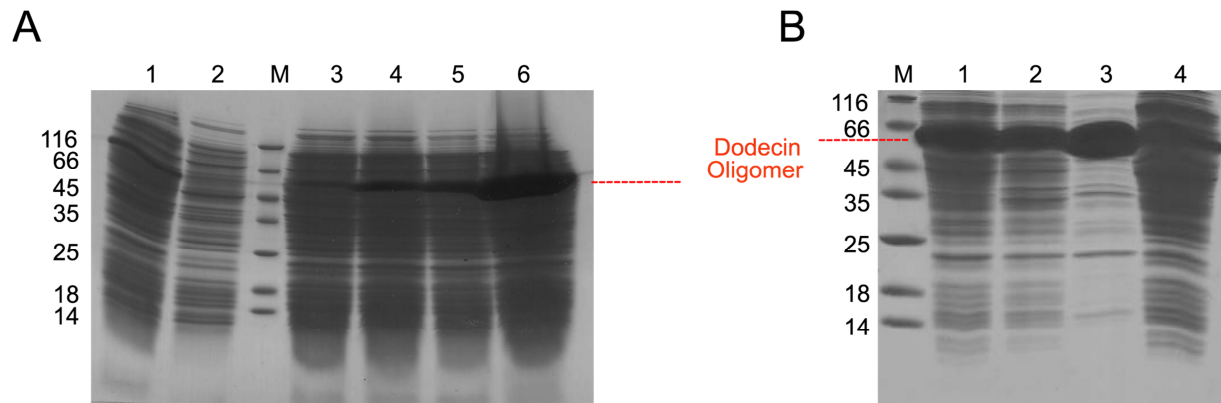


Abb. 46: 15 % SDS-PAGE-Gele der Testexpression und des Löslichkeitstest des *P. aeruginosa* Dodecins
A: Testexpression des *P. aeruginosa* Dodecins in TB durch Autoinduktion. Bahn 1: Übernachtskultur von BL21-Gold(DE3)/Padode-pET28, $OD_{595}=2.66$; Bahn 2: 2 h nach Animpfen; Bahn 3: 4 h nach Animpfen; Bahn 4: 6 h nach Animpfen; Bahn 5: 8 h nach Animpfen; Bahn 6: 24 h nach Animpfen, $OD_{595}=17.6$. Aufgetragen wurden jeweils 10 μ L einer Zellsuspension des Bakterienpellets aus 1 mL Kultur in 100 μ L Extraktionsmedium. B: Löslichkeitstest und Hitzefällung nach Autoinduktion in TB. Bahn 1: Überstand nach Aufschluss; Bahn 2: Pellet nach Aufschluss; Bahn 3: Überstand nach Hitzefällung; Bahn 4: Pellet nach Hitzefällung.

Die weitere biochemische Charakterisierung des *P. aeruginosa* Dodecins wurde von Bodo Sander durchgeführt [147].

3.5 Charakterisierung der *Pseudomonas aeruginosa* Dodecin-Knockout-Mutante

Um *in vivo* die Bedeutung des Dodecingens zu untersuchen, wurde eine Deletion des Dodecingens in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 vorgenommen. Hierzu wurde ein Deletionssystem verwendet, das auf dem pEX18Ap Suicidevektor basiert [154]. In dem erzeugten Vektor pΔdodecin ist das Dodecingen PA0038 durch eine Gentamycin Resistenzcassette *aacC1* ersetzt, die von zwei jeweils etwa 500 bp Fragmenten homologer DNA Bereiche flankiert ist. Außerdem enthält der Vektor eine Ampicillin Resistenzcassette *bla* und das *sacB*-Gen, das für das Enzym Levansucrase codiert. Dieses wandelt Saccharose in einen Fructosepolymer, was zum Tode des Bakteriums führt. Zurückzuführen ist dies vermutlich entweder auf eine Verstopfung des periplasmatischen Raumes durch die Akkumulation der Fructosepolymere oder durch die Übertragung von Fructose auf bestimmte Rezeptormoleküle [101].

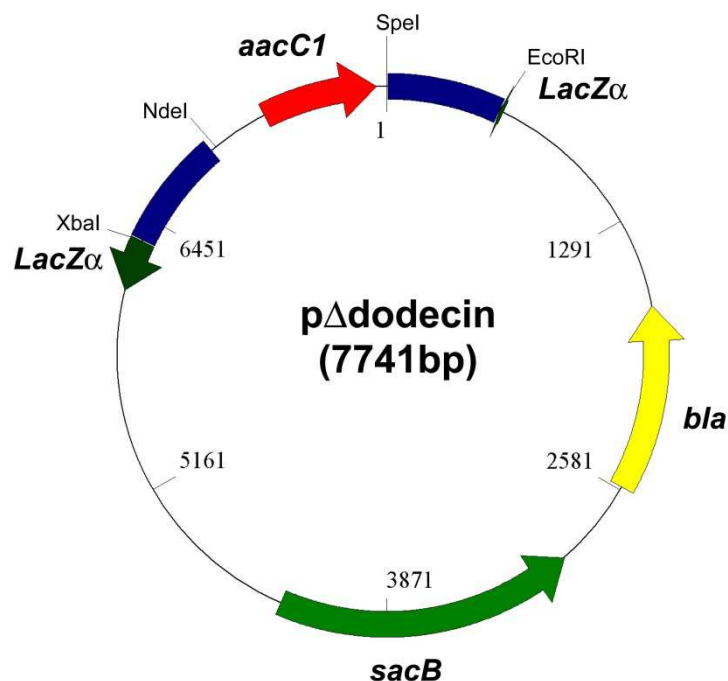


Abb. 47: Plasmidkarte des Vektors pΔdodecin

Die blauen Bereiche repräsentieren die 5' und 3' homologen Bereiche des Dodecingens PA0038. Das *aacC1*-Gen verleiht Gentamycinresistenz, das *bla*-Gen Ampicillinresistenz. Außerdem enthält der Vektor das Levansucrase-codierende Gen *sacB*.

Wird der erzeugte Vektor pΔdodecin zum Knockout in *P. aeruginosa* eingesetzt, sind entweder ein *single crossover* oder ein *double crossover* möglich. Bei einem *single crossover* wird der gesamte Vektor in das Genom integriert, die erzeugten Kolonien sind sowohl Gentamycin- als auch Ampicillin-resistent und sterben auf Saccharose-haltigem Medium ab. Bei dem erwünschten *double crossover* ist das Dodecingen durch die Gentamycincassette ersetzt. Die Gentamycin-resistenten Klone sollten bei Gegenselektion auf Saccharose-haltigem Medium normales Wachstum aufweisen.

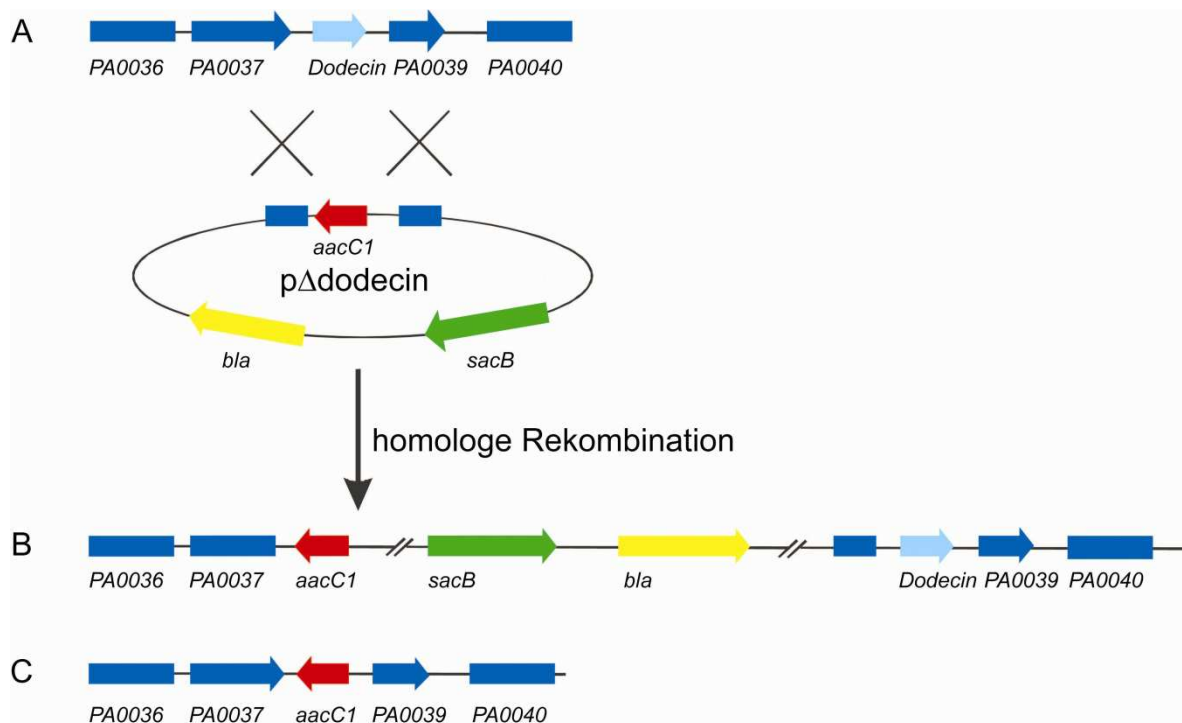


Abb. 48: Deletion des Dodecingens PA0038

A: Dargestellt ist der Ausschnitt aus dem Genom von *P. aeruginosa*, der das für Dodecin codierende Gen PA0038 sowie die 5' und 3' homologen Bereiche enthält, sowie der Dodecin-Knockout-Vektor pΔdodecin.

B: Genom nach einem *single crossover*, bei dem der gesamte Vektor in das Genom integriert wurde. Kolonien, bei denen ein *single crossover* stattgefunden hat, sollten Gentamycin- und Ampicillin-resistent sein. Durch Integration des sacB Gens sind diese Kolonien jedoch auf Saccharose-haltigem Medium nicht überlebensfähig.

C: Genom nach *double crossover*, hier wurde das Dodecingen durch die Gentamycin Resistenzcassette ersetzt.

3.5.1 Klonierung des *Pseudomonas aeruginosa* Dodecin-Knockout-Vektors

pΔdodecin

Für die Klonierung des Dodecin-Knockout-Vektors pΔdodecin wurde zunächst ein 1303 bp Fragment bestehend aus dem PA0038-ORF und 529 bp stromaufwärts und 543 bp stromabwärts mittels PCR aus chromosomaler DNA von *P. aeruginosa* PAO1 amplifiziert.

Hierzu wurde die Platinum TaqDNA Polymerase High fidelity (*Invitrogen*) sowie die Oligonucleotide padode1c 5'-GACCGAATTCCATGCAGGTCTTCGAACTGG-3' und padode 2c 5'-CACCTCTAGACCGTTAGATGGCACGCTTTC-3' verwendet, die Schnittstellen für EcoRI und XbaI einführen. Das erhaltene Fragment wurde nach PCR-Aufreinigung sequentiell mit EcoRI und XbaI verdaut, erneut aufgereinigt und dann mit dem Vektor pEX18Ap ligiert. Dieser wurde zuvor ebenfalls sequentiell mit EcoRI und XbaI geschnitten und das gewünschte Fragment wurde nach Hitzeinaktivierung der Enzyme aus einem Agarosegel extrahiert und aufgereinigt. Nach Entsalzung durch Dialyse wurde der Ligationsansatz in elektrokompente *E. coli* DH5 α transformiert und auf Amp¹⁰⁰-haltigem LB-Agar ausplattiert. 3 mL LB-Amp¹⁰⁰ Übernachtskulturen wurden jeweils mit einer Einzelkolonie angeimpft und nach Inkubation bei 37 °C eine *quick-and-dirty* Plasmidpräparation durchgeführt.

Nach erfolgtem Kontrollverdau diente das resultierende Plasmid als Templat für eine inverse PCR, bei der der komplette Vektor exklusive des Dodecin-codierenden Bereichs amplifiziert wurde. Hierfür wurden die Primer padode3 5'-GAACACTAGTGAACCTCTCTCCCCGGACG-3' und padode4 5'-GGATATC CATATGTGGCACCCCTGGAAACCTG-3' eingesetzt, die Schnittstellen für SpeI und NdeI einführen. Nach Gelextraktion des PCR-Produktes, Verdau des 6911 bp-Fragments mit SpeI und NdeI mit anschließender Hitzeinaktivierung und Aufreinigung erfolgte eine Ligation mit dem *aacCI*-Gen, das für eine Gentamycincassette codiert. Dieses Gen wurde mittels PCR unter Verwendung des Plasmids pX1918G und der Primer gmcassup 5'-GGAATTCCATATGCGGTTCGGCCAGCGGCAAG-3' und gmcassdown 5'-GAAACTAGTCCGAACAACCTCCGCGGCCGGGAAG-3' unter Einführung der Schnittstellen für SpeI und NdeI amplifiziert. Das erhaltene 861 bp-Fragment wurde nach PCR-Aufreinigung und Verdau mit SpeI und NdeI aus einem präparativen Agarosegel extrahiert und aufgereinigt. Der durch Dialyse entsaltete Ligationsansatz wurde in elektrokompente *E. coli* DH5 α -Zellen transformiert und auf LB-Amp¹⁰⁰Gen¹⁵-Platten ausplattiert.

3 mL LB-Kan¹⁰⁰Gm¹⁵ Übernachtskulturen wurden jeweils mit einer Einzelkolonie angeimpft und nach Inkubation eine *quick-and-dirty* Mini-Plasmidpräparation durchgeführt. Der Kontrollverdau des resultierenden Vektors p Δ dodecin mit SpeI und NdeI auf das Vorhandensein der Gentamycincassette ergab, dass alle zehn getesteten Klone das gewünschte Fragment enthielten.

3.5.2 Deletion des Dodecingens

In der Arbeitsgruppe von M. Schobert (TU Braunschweig) wurden Konjugationsexperimente der erzeugten Vektoren p Δ dodecin mit *P. aeruginosa* durchgeführt. Die Anwesenheit der Gentamycincassette und damit der Knockout des Dodecingens wurde schließlich nach Restriktionsverdau der genomischen DNA der Klone Dod1, Dod2, Dod3 mit den Enzymen MluI und EagI durch Southernblot nachgewiesen.

3.5.3 Phänotypenscreening

Um das Wachstumsverhalten der Dodecin-Knockoutmutante im Verhältnis zum Wildtyp PAO1 [155] zu untersuchen, wurden zunächst Wachstumskurven unter verschiedenen Standardbedingungen aufgenommen. Getestet wurde das Wachstum unter aeroben (Abb. 49 A und C) und anaeroben Bedingungen (Abb. 49 B und D), in LB-Medium sowie AB-Medium – einem Minimalmedium definierter Zusammensetzung (siehe Abb. 49). Wie zu erwarten, wurde unter anaeroben Bedingungen ein langsamerer Anstieg und geringere End-ODs erreicht; auch zeigte sich ein langsamerer Anstieg und geringere End-ODs, wenn ein Minimalmedium verwendet wurde. Es konnte jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen WT und Knockoutmutante beobachtet werden.

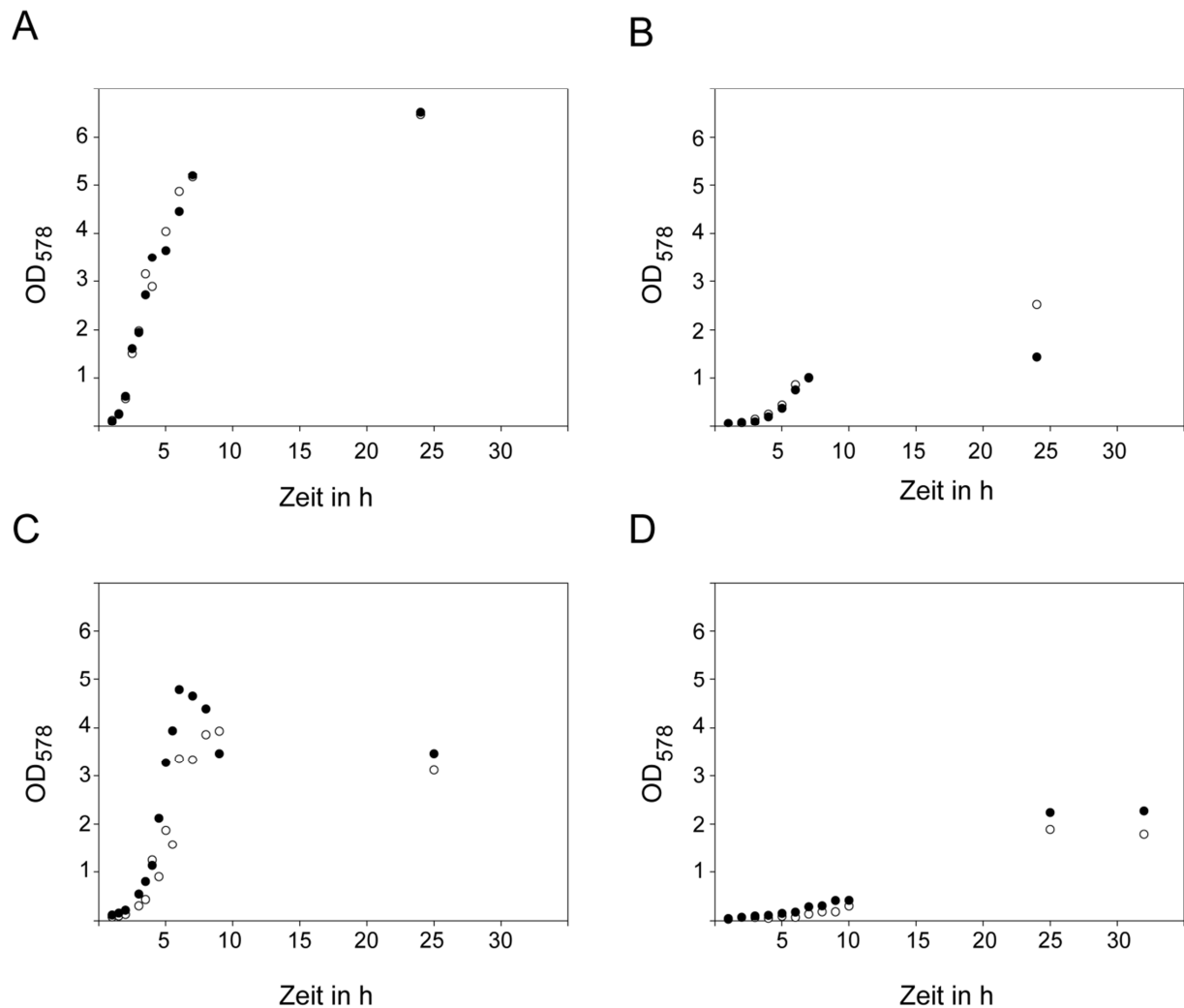


Abb. 49: Wachstumskurven von *P. aeruginosa* unter aeroben und anaeroben Bedingungen

A: Wachstumskurven unter aeroben Bedingungen in LB-Medium. B: Wachstumskurve unter anaeroben Bedingungen in LB-Nitrat-Medium. C: Wachstumskurven unter aeroben Bedingungen in AB-Medium. D: Wachstumskurven unter anaeroben Bedingungen in AB-Medium. Aufgetragen ist jeweils die gemessene OD₅₇₈ gegen die Zeit in h. Die geschlossenen Kreise (●) repräsentieren das Wachstumsverhalten des WT PAO1, die offenen Kreise (○) das Wachstumsverhalten der Dodecin-Knockoutmutante ΔDodecin.

Neben Wachstumskurven unter den oben angegebenen Bedingungen wurde auch das Überleben der Dodecin-Knockout-Mutante in der anaeroben Stationärphase im Vergleich zum WT untersucht. Hierbei wurden die Zellen in LB-Nitrat anaerob inkubiert und während der stationären Phase (20 h, 26 h, 44 h bzw. 50 h nach Animpfen) Proben entnommen. Zellen der jeweils angegebenen Verdünnung wurden ausplattiert und nach Inkubation die Kolonien ausgezählt. Diese Methode hat im Gegensatz zu der Aufnahme von Wachstumskurven den Vorteil, dass hier nur die noch lebenden Zellen berücksichtigt werden.

Wie zu erwarten, findet eine Abnahme der Zellen mit der Zeit statt, jedoch ist kein signifikanter Unterschied zwischen WT und Dodecin-Knockout-Mutante festzustellen.

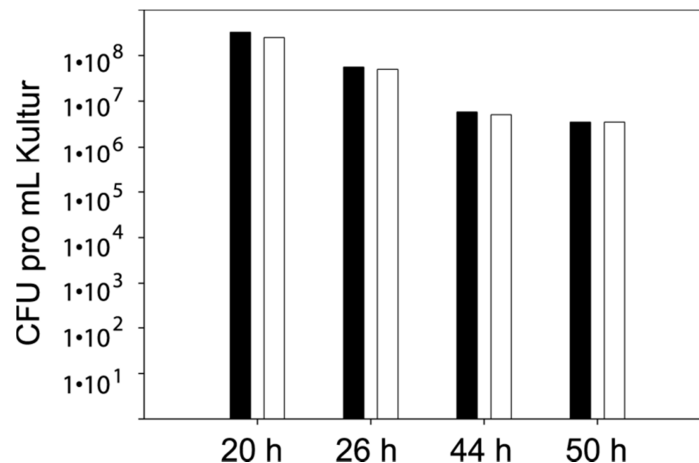


Abb. 50: *P. aeruginosa* Assay zum Überleben in der anaeroben Stationärphase

Bestimmt wurde die Lebendzellzahl des WT PAO1 (schwarz) und der Dodecin-Knockoutmutante Δ Dodecin (weiß) nach Wachstum in LB-Nitrat unter anaeroben Bedingungen nach Erreichen der Stationärphase. Aufgetragen wurden die Anzahl der Kolonien pro mL Kultur folgender ausplattierter Verdünnungen: 100 μ L der 10^{-5} -Verdünnung (20 h), 50 μ L der 10^{-4} -Verdünnung (26 h), 50 μ L der 10^{-3} -Verdünnung (44 h), 50 μ L der 10^{-3} -Verdünnung (50 h). Hierbei handelt es sich um eine Einfachbestimmung.

Da freie Flavine unter Lichteinfluss den Abbau aromatischer Aminosäuren begünstigen und somit zu einem Zelltod führen [156], wurde der Einfluss von Tryptophan und Riboflavin auf das Zellwachstum untersucht. Hierzu wurden Wachstumskurven des WT PAO1 und der Dodecin-Knockoutmutante in Tryptophan- und Riboflavin-haltigem Minimalmedium sowie in einem beide Substanzen enthaltendem Minimalmedium aufgenommen. Ausgehend von den Kulturen wurde schließlich die Lebendzellzahl nach 24 bzw. 31 h bestimmt.

Anhand der Wachstumskurven lässt sich beobachten, dass der Zusatz von Tryptophan oder Riboflavin das Wachstum der Zellen zu begünstigen scheint. Auch scheint der WT unter den meisten Bedingungen besser anzuwachsen als die Knockoutmutante. Betrachtet man jedoch die Lebendzellzahl, so ist dieser Trend hier nicht zu beobachten. Während sich Tryptophan günstig auf das Wachstum der Zellen auszuwirken scheint, Riboflavin jedoch eher ungünstig, werden unter Riboflavin-haltigen Bedingungen unwesentlich höhere Lebendzellzahlen erreicht, während Tryptophan keinen Einfluss zu haben scheint. Der Zusatz beider Substanzen zeigt ähnliche Lebendzellzahlen wie die Kontrolle. Signifikante Unterschiede bei der Lebendzellzahlbestimmung zwischen WT und der Dodecin-Knockoutmutante konnten in diesem Versuch nicht festgestellt werden.

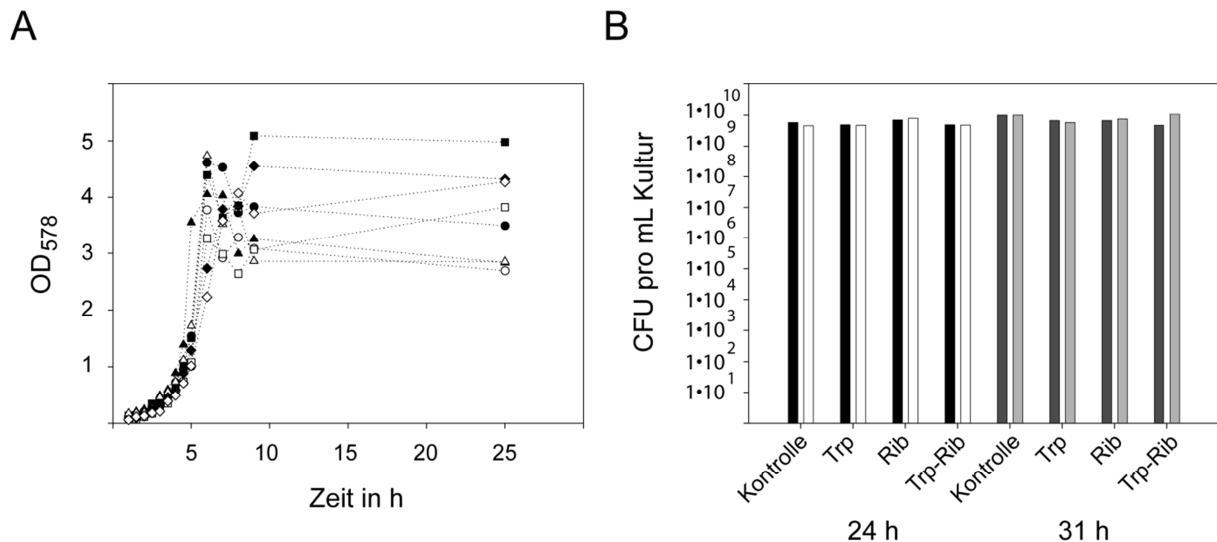


Abb. 51: *P. aeruginosa* Assay zur Untersuchung des Wachstums in Tryptophan- und Riboflavin-haltigem Medium

A: Wachstumskurve des WT PAO1 (ausgefüllte Symbole) sowie der Dodecin-Knockoutmutante Δ Dodecin (offene Symbole) in Tryptophan- (Quadrate), Riboflavin- (Dreiecke) bzw. Tryptophan- und Riboflavin-haltigem (Rauten) AB-Medium. Als Kontrolle diente AB-Medium ohne Zusätze (Kreise). Aufgetragen wurde die gemessene OD₅₇₈ gegen die Zeit in h.

B: Lebendzellzahlbestimmung nach Wachstum in obigem Medium (siehe Legende zu Abbildung A) nach 24 bzw. 31 h. Ausplattiert wurden 100 μ L der 10^{-7} - (hier nicht gezeigt) und 50 μ L der 10^{-6} -Verdünnung. Bestimmt wurde die Anzahl der Kolonien pro mL Kultur des WT PAO1 (schwarze bzw. dunkelgraue Balken) sowie der Dodecin-Knockoutmutante Δ Dodecin (weiße bzw. hellgraue Balken). Es handelt sich hierbei um eine Einfachbestimmung.

Um den Einfluss reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffspezies auf das Wachstumsverhalten zu untersuchen, wurden Versuche mit den ROI- (*reactive oxygen intermediates*) produzierenden Reagentien Wasserstoffperoxid und Paraquat sowie dem NO-freisetzenden SNP durchgeführt. Der Einfluss von Peroxid auf die Sterberate des WT PAO1 und der Dodecin-Knockoutmutante wurde zum einen durch die Bestimmung der Lebendzellzahl nach 20 bzw. 40 min Inkubation mit 30 % H₂O₂ (Abb. 52 A), zum anderen durch das Auftreten eines Hemmhofes (Abb. 52 B) untersucht. Wie erwartet, führte die Inkubation mit Peroxid zu einer Verringerung der Lebendzellzahl, so dass nach 20 min eine Verringerung um den Faktor 100, nach 40 Minuten eine Verringerung um den Faktor 1000 erreicht wird, doch ist hier kein signifikanter Unterschied zwischen WT und Mutante zu beobachten. Auch der Disk-Assay weist zwar eine deutliche Abhängigkeit des Hemmhofdurchmessers von der Peroxidkonzentration auf, doch ist auch hier kein Unterschied zwischen WT und Mutante zu verzeichnen.

Ähnliches ist bei der Bildung eines Hemmhofes nach Paraquatinkubation (Abb. 52 C) zu beobachten. Zwar nimmt mit steigender Paraquatkonzentration der Durchmesser des Hemmhofes zu, doch besteht wiederum kein Unterschied zwischen WT und Mutante.

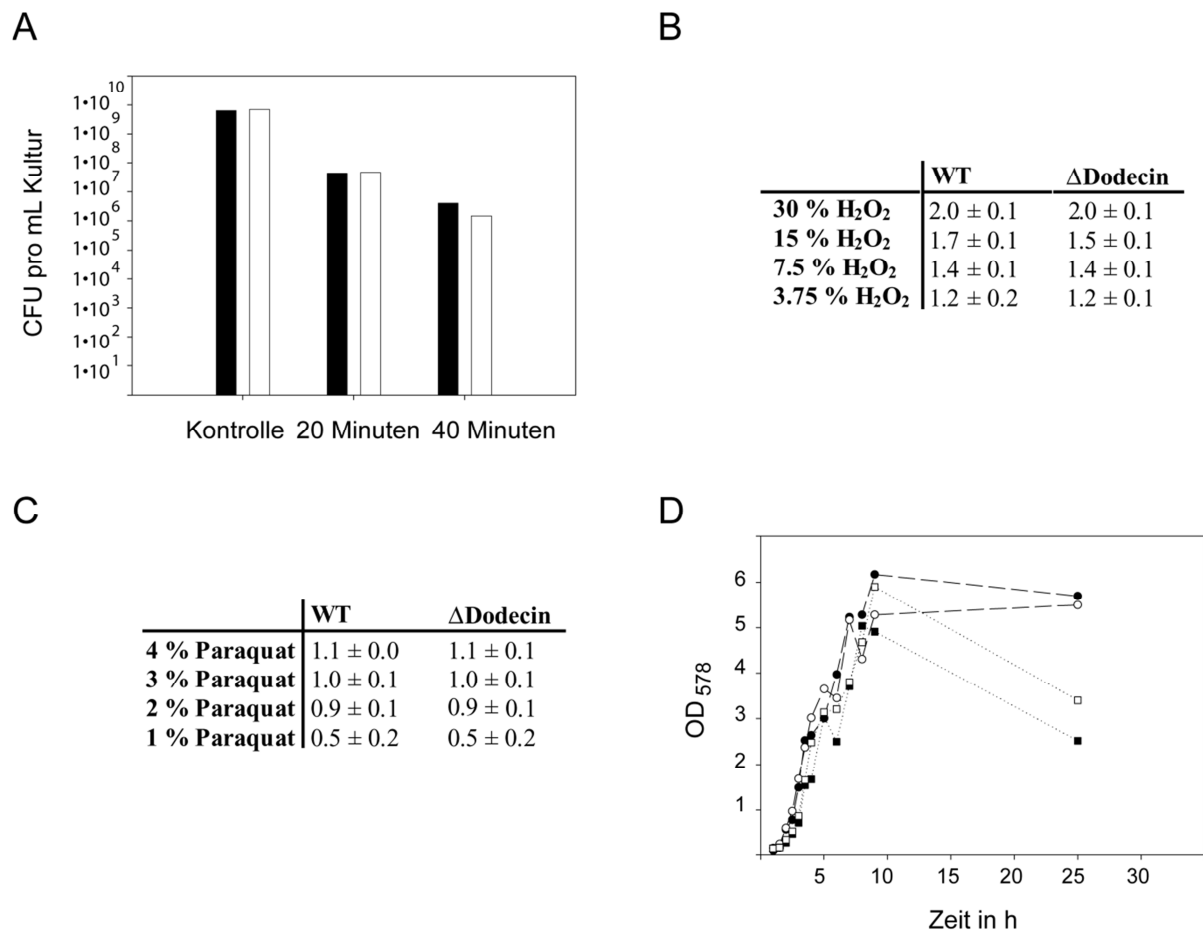


Abb. 52: *P. aeruginosa* Assay zur Untersuchung von Radikalstress

A: Lebendzellzahlbestimmung nach Peroxidstress. Bestimmt wurde die Anzahl der Kolonien des WT PAO1 (schwarz) und der Dodecin-Knockoutmutante ΔDodecin (weiß) pro mL Kultur des 0-Wertes (Kontrolle) und nach 20 bzw. 40 Minuten Inkubation mit 30 % H₂O₂. Ausplattiert wurden 100 μL der 10⁻⁷-Verdünnung des 0-Minuten-Wertes als Kontrolle sowie 50 μL der 10⁻⁴- (hier nicht gezeigt) und 100 μL der 10⁻⁵-Verdünnung des 20 Minuten-Wertes und 50 μL der 10⁻³- (hier nicht gezeigt) und 100 μL der 10⁻⁴-Verdünnung des 40 Minuten-Wertes. Hierbei handelt es sich um eine Einfachbestimmung.

B: Disk-Assay nach Peroxidstress. Bestimmt wurde der Durchmesser der Wachstumsinhibierungszone des WT PAO1 und der Dodecin-Knockoutmutante ΔDodecin um ein Filterpapier, das mit 10 μL der jeweils angegebenen Peroxidkonzentration imprägniert wurde. Es wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Die angegebene Standardabweichung bezieht sich auf die Unterschiede zwischen diesen drei Messungen.

C: Disk-Assay nach Paraquatstress. Bestimmt wurde der Durchmesser der Wachstumsinhibierungszone des WT PAO1 und der Dodecin-Knockoutmutante ΔDodecin um ein Filterpapier, das mit 10 μL der jeweils angegebenen Paraquatkonzentration imprägniert wurde. Es wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Die angegebene Standardabweichung bezieht sich auf die Unterschiede zwischen diesen drei Messungen.

D: Wachstumskurve in NO-generierendem Medium. Gemessen wurde die OD₅₇₈ des WT PAO1 (●), der Dodecin-Knockoutmutante ΔDodecin (○) in LB-Medium, bzw. WT PAO1 (■) und der Dodecin-Knockoutmutante ΔDodecin (□) in LB-SNP-Medium. Aufgetragen wurde die gemessene OD₅₇₈ gegen die Zeit in h.

Die Auswirkung freier Stickstoffradikale wurde mit dem NO-produzierenden Reagenz SNP getestet. Wachstumskurven des WT PAO1 und der Dodecin-Mangelmutante in SNP- (10 mM Endkonzentration) haltigem Medium stiegen zwar geringfügig langsamer an und besaßen

geringere End-ODs als die jeweiligen Kontrollen in LB-Medium, doch bestand wieder kein signifikanter Unterschied zwischen WT und Mutante. Ein Disk-Assay mit 0.5 M SNP ergab keinen Hemmhof (hier nicht gezeigt).

Neben dem Einfluss reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffspezies wurde auch der Einfluss von Hitze und UV-Licht auf die Dodecin-Knockout-Mutante im Vergleich zum Wildtyp PAO1 untersucht. Ein Unterschied zwischen Mutante und Wildtyp könnte auf eine Funktion der sehr hitzestabilen Dodecine als Hitzeschock-Proteine hinweisen. Mögliche Dodecin-Hitzeschockproteine könnten dann die durch Proteindegradation hitzeempfindlicher Proteine freigesetzten Flavine binden, die unter speziellen Bedingungen wie UV-Licht oder hohe Dosen sichtbaren Lichts schädlich für die Zellen wären.

Zur Untersuchung der Auswirkung von UV-Licht auf Wachstum und Überleben der Zellen wurden Zellsuspensionen auf LB*-Agar ausplattiert und die Platten UV-Dosen von 1, 2 und 4 mJ ausgesetzt. Als Kontrolle dienten ausplattierte Zellsuspensionen, die nicht dem UV-Licht ausgesetzt worden waren. Wie zu erwarten, nahm die Anzahl der Kolonien mit steigender UV-Dosis ab. Größere, jedoch noch nicht signifikante Unterschiede sind aber erst bei einer Dosis von 4 mJ zu beobachten.

Zur Untersuchung der Hitzestabilität wurden die Zellen 60 min bei 53 °C inkubiert, auf LB*-Agar ausplattiert und nach Inkubation die Lebendzellzahl bestimmt. Als Kontrolle dienten hier nicht erhitzte Zellen. Zu beobachten ist hier eine deutliche Abnahme der überlebenden Zellen nach Hitzeschock im Vergleich zur nicht erhitzten Probe, jedoch ist wiederum kaum ein Unterschied zwischen WT und Dodecin-Knockout-Mutante festzustellen.

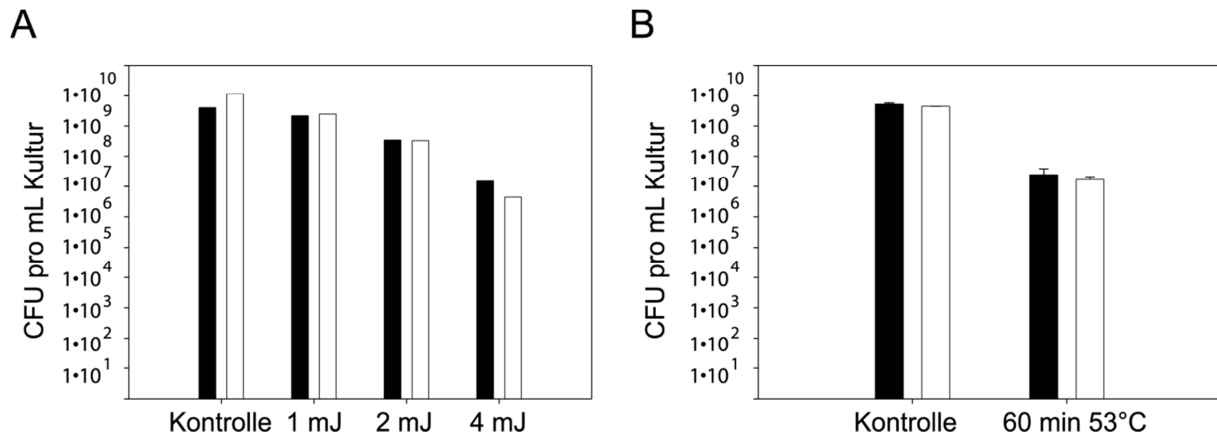


Abb. 53: *P. aeruginosa* Assay zur Untersuchung der Stabilität gegenüber UV-Licht und Hitze

A: Bestimmung der Lebendzellzahl nach UV-Stress. Es wurden 100 μ L der 10^{-6} -, 10^{-5} - und 10^{-4} -Verdünnungen des WT PAO1 (schwarz) bzw. der Dodecin-Knockoutmutante Δ Dodecin (weiß) auf LB-Agar ausplattiert und UV-Dosen von 1, 2 bzw. 4 mJ ausgesetzt. Zur Kontrolle wurden 100 μ L einer 10^{-7} -Verdünnung ausplattiert und nicht dem UV-Licht ausgesetzt. Aufgetragen wurde die Anzahl pro mL Kultur der 10^{-7} -Verdünnung (Kontrolle), der 10^{-6} -Verdünnung (1 mJ), der 10^{-5} -Verdünnung (2 mJ) sowie der 10^{-4} -Verdünnung (4 mJ).

B: Bestimmung der Lebendzellzahl nach Hitzeschock. Bestimmt wurde die Anzahl der Kolonien pro mL Kultur des WT PAO1 (schwarz) und der Dodecin-Knockoutmutante Δ Dodecin nach Inkubation einer 10^{-2} -Verdünnung für 60 min bei 53 °C bzw. einer nicht inkubierten Probe (Kontrolle). Ausplattiert wurden 50 μ L der 10^{-6} -Verdünnung (Kontrolle) sowie 100 μ L der 10^{-5} - (hier nicht gezeigt) und 10^{-4} -Verdünnung (60 min 53 °C). Aufgetragen sind der Mittelwert einer Doppelbestimmung sowie die Standardabweichung vom Mittelwert.

3.5.4 Pathogenizitätstest

Da es sich bei dem pathogenen Bakterium *Pseudomonas aeruginosa* um einen *multi-host*-Organismus handelt, eignen sich zur Untersuchung von *P. aeruginosa* Virulenzfaktoren auch auf Pflanzen basierende Modellsysteme, so dass Pathogenizitätstest, die auf der Infektion von Säugetieren beruhen (*mouse-bourne-model*), vermieden werden können [114, 157].

Um die Pathogenizität der Dodecin-Knockout-Mutante in einem größeren Kontext betrachten zu können, wurden als Vergleichsstämme nicht nur der Wildtyp PAO1, sondern auch der Stamm PAO6261, der eine Deletion des *anr*-gens aufweist, das für den anaeroben Regulator ANR (*anr* für anaerobic regulation of arginine deiminase and nitrate reduction) codiert [158] und eine geringere Pathogenizität als der Wildtyp PAO1 besitzt (Max Schobert, persönliche Mitteilung), herangezogen. Des weiteren diente der Stamm UCBPP-PA14 (im folgenden PA14) als Vergleichsorganismus, bei dem es sich um ein gut charakterisiertes, menschliches klinisches *P. aeruginosa*-Isolat von höherer Pathogenizität als der Stamm PAO1 [157, 159] handelt, das oft bei Pathogenizitätsstudien verwendet wird.

Wie erwartet, zeigte das Salatblatt, das mit dem Wildtyp PA01 infiziert wurde, eine deutliche Braunfärbung an der Infektionsstelle der Mittelrippe, während sich die Infektion bei dem höchst virulenten Stamm PA14 fast über das gesamte Salatblatt ausgebreitet hatte. Nahezu keine Verfärbung ließ sich bei der weniger virulenten anr-Mutante erkennen. Interessanterweise konnte für die Dodecin-Knockout-Mutante eine im Vergleich zum Wildtyp verringerte Pathogenizität beobachtet werden, die nahezu der der anr-Mutante entsprach. Allerdings konnte dieses Ergebnis nicht reproduziert werden.

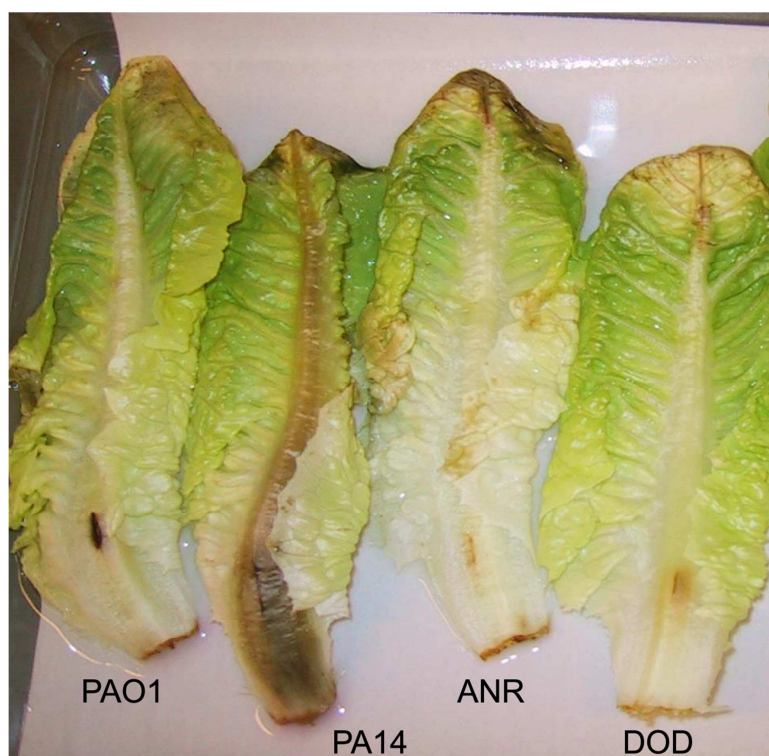


Abb. 54: *P. aeruginosa* Salatpathogenizitätstest

Gezeigt ist hier die Pathogenizität verschiedener *P. aeruginosa* Stämme. Verwendet wurden neben der Dodecin-Knockout-Mutante als Kontrollen der Stamm PA01, der hoch virulente PA14-Stamm sowie der weniger pathogene Stamm PA06261 (ANR). Nach Injektion von 10 µL einer 1:100-Verdünnung in 10 mM MgSO₄ wurden die Salatblätter 5 Tage bei 30 °C in einer geschlossenen Schale inkubiert.

4 Diskussion

4.1 Dodecine – Vorkommen und Klassifizierung

Zur Zeit der Entdeckung der Dodecine im archaealen Organismus *Halobacterium salinarum* zu Beginn dieses Jahrhunderts konnten durch BLAST-Suchen [160] Dodecin-codierende Gene nur in wenigen eubakteriellen Organismen gefunden werden (z. B. in *M. tuberculosis*, *S. meliloti*, *B. pertussis*, *B. bronchoseptica*, *P. aeruginosa*, *P. putida*, *C. tepidum*, *G. sulfurreducens* [94]). Durch verbesserte technische Möglichkeiten stieg in den letzten Jahren die Zahl der sequenzierten bakteriellen Genome stetig an (520 bakterielle Genome im Jahr 2007), und hat in diesem Jahr die Zahl 25000 überschritten (www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/browse/). Durch NCBI-PSI-BLAST-Suchen können mittlerweile etwa 1200 Dodecine identifiziert werden; in der Pfam (Protein families) Datenbank [161] bilden die Dodecine eine eigene Familie.

Zu der Pfam-Familie der Dodecine (PF07311), zählen mittlerweile 611 Dodecine aus 529 Spezies – 505 Bakterien und 24 Archaeabakterien (Stand von Pfam 27.0, März 2013).

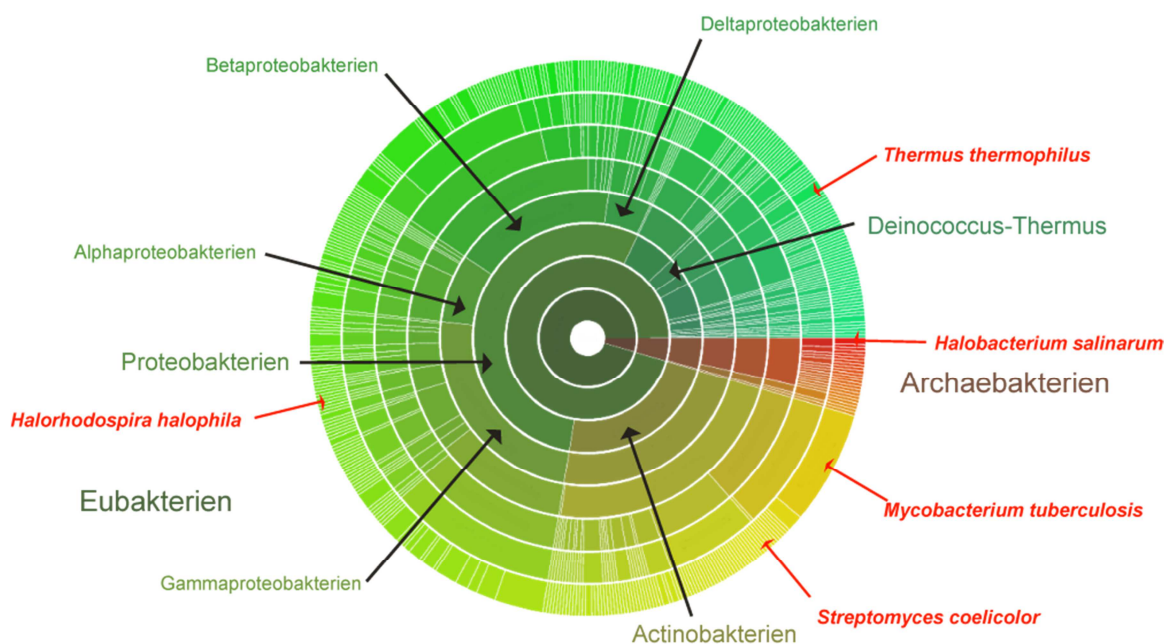


Abb. 55: Phylogenetische Analyse der Dodecin enthaltenden Species

Diese Darstellung wurde der Pfam-Datenbank entnommen (www.pfam.xfam.org). Die einzelnen Ringe entsprechen den verschiedenen taxonomischen Hierarchien. Die 505 eubakteriellen Dodecin enthaltenden Organismen verteilen sich auf 122 Actinobakterien, 24 Bakteroides, 289 Proteobakterien, 2 Planctomyceten, 1 Lentisphaera, 1 Synergistete, 3 Chloroflexi, 31 Firmicutes, 4 Chlamydien, 1 *Caldithrix abyssi*, 9 *Deinococci-Thermi*, 7 *Verrucomicrobiae*, 12 *Clorobia*, 1 *Nitrospirae*. Die 24 archaealen Dodecin enthaltenden Organismen sind beinhalten ein halophiles Archaeon und 23 Euryarchaea, die sich in 4 Methanomicrobien und 19 Halobakterien unterteilen. In rot sind diejenigen Spezies eingezeichnet, von denen strukturelle Eigenschaften bekannt sind.

Dodecine kommen hier vor allem in den Aktinobakterien und den Proteobakterien, aber auch in Bacteroidetes, Firmicutes, Deinococcus-Thermi und Chlorobia vor (siehe Abb. 55). Auffällig ist hierbei das große Vorkommen in pathogenen Organismen (*M. tuberculosis*, *P. aeruginosa*, *L. pneumophila*, *B. pertussis* etc.) als auch im Bakterien, die für ihre biotechnologisch wichtigen Stoffwechselwege bekannt sind (*C. tepidum*, *G. sulfurreducens*, etc.). Archaeale Dodecine, die innerhalb des Dodecinstammbaums einen eigenen Zweig bilden (siehe Abb. 56), kommen bislang ausschließlich in den Euryarchaea vor.

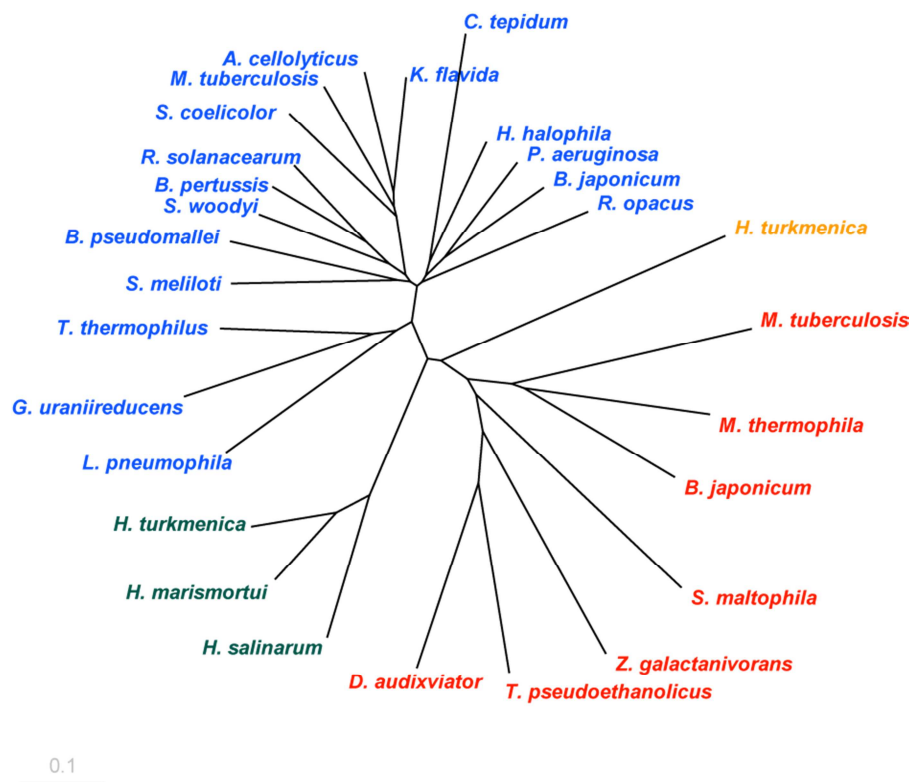


Abb. 56: Stammbaumdarstellung der Dodecine aus *Thermus thermophilus*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Streptomyces coelicolor*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Halorhodospira halophila*, *Geobacter uraniireducens*, *Shewanella woodyi*, *Leginella pneumophila*, *Acidothermus cellolyticus*, *Bordetella pertussis*, *Burkholderia pseudomallei*, *Kribella flavida*, *Bradyrhizobium japonicum*, *Rhodococcus opacus*, *Chlorobium tepidum*, *Ralstonia solanacearum*, *Sinorhizobium meliloti*, *Haloarcula marismortui*, *Halobacterium salinarum*, *Methanosaeta thermophila*, *Zobellia galactanovorans*, *Haloterrigena turkmenica*, *Thermoanaerobacter pseudoethanolicus*, *Desulfurudis audaxviator* und *Stenotrophomonas maltophila*.

Blau dargestellt sind eubakterielle Flavin-bindende Dodecine, grün archaebakterielle Flavin-bindende Dodecine, rot eubakterielle nicht-Flavin-bindende Dodecine, orange archaebakterielle nicht-Flavin-bindende Dodecine.

Die Darstellung dieses phylogenetischen Baumes erfolgte mit Treeview [162] auf der Grundlage eines mit ClustalOmega [163] erzeugten *phylogenetic tree files*. Hier wurde die *neighbour joining* Methode ohne Abstandskorrekturen verwendet.

Von 611 in der Pfam-Datenbank enthaltenen Dodecinsequenzen enthalten jedoch 195 nicht die für die Flavinbindung essentielle Aminosäure W38, so dass für diese nicht W-Typ-

Dodecine die Funktion der Flavinbindung ausgeschlossen werden kann (siehe Abb. 57 C). Diese nicht-Flavin-bindenden Orthologen bilden innerhalb der Dodecine eine eigene Gruppe (siehe Abb. 56) und kommen dabei hauptsächlich in den Bacteroidetes, den Firmicutes, den archaealen Methanomicrobien und den *Mycobacterium* Species vor. Die Funktion der nicht-W-Typ-Dodecine scheint die Bindung kleiner Moleküle zu sein; so wurde für das Dodecin Rv0379 aus *Mycobacterium tuberculosis*, das die gleiche Quartärstruktur wie Flavin-bindende Dodecine aufweist, die Bindung eines sechsfach koordinierten Calciumions postuliert [164]. Das Calciumbindungsmotiv bestehend aus W18, Y56 und E19 ist jedoch nur in 106 Dodecinsequenzen enthalten, so dass die übrigen 89 Dodecine vermutlich einen weiteren bislang noch nicht identifizierten Kofaktor binden.

Die in allen Dodecinen (vom W-Typ und nicht-W-Typ) konservierten Reste S14, A21, A25, A29, V41 dienen der Stabilisierung der Tertiärstruktur durch Wasserstoffbrückenbindungen (S14) bzw. hydrophobe Wechselwirkungen (A21, A25, A29 und V41) – unabhängig von der Art des gebundenen Kofaktors.

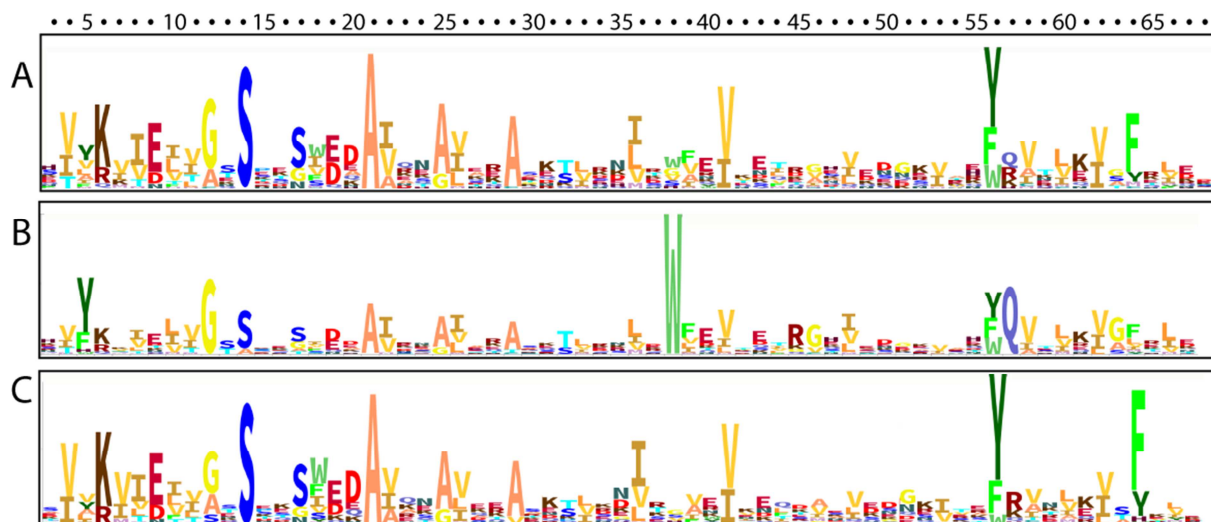


Abb. 57: HMM-Logo der Familie der Dodecine

A: HMM- (Hidden-Markov-Model-) Logo aller 611 Dodecine, B: Logo aller 417 putativen Flavin-bindenden Dodecine vom W-Typ mit dem Rest W38, C: Logo aller 194 Dodecine, die keinen W38-Rest aufweisen (nicht-W-Typ), und deshalb auch kein Flavin binden.

Die Nummerierung oberhalb der Abbildung entspricht der des *T. thermophilus* Dodecins. Die Höhe der Buchstaben entspricht deren prozentualem Vorkommen in den Dodecinen nach Reduzierung des Backgrounds. Rote (DEHKR), blaue (CNPQST), grüne (FWY), gelb/rosa/orange (AGILVM) colorierte Buchstaben entsprechen geladenen, polaren/ungeladenen, aromatischen und aliphatischen Aminosäuren.

Die HMM-Model-Logos [165] wurden mit dem Programm LogoMat-M auf dem HMM-logo-Server Skygign <http://skygign.org> generiert. Die hierfür benötigten Sequenzen wurden der Pfam-Datenbank entnommen.

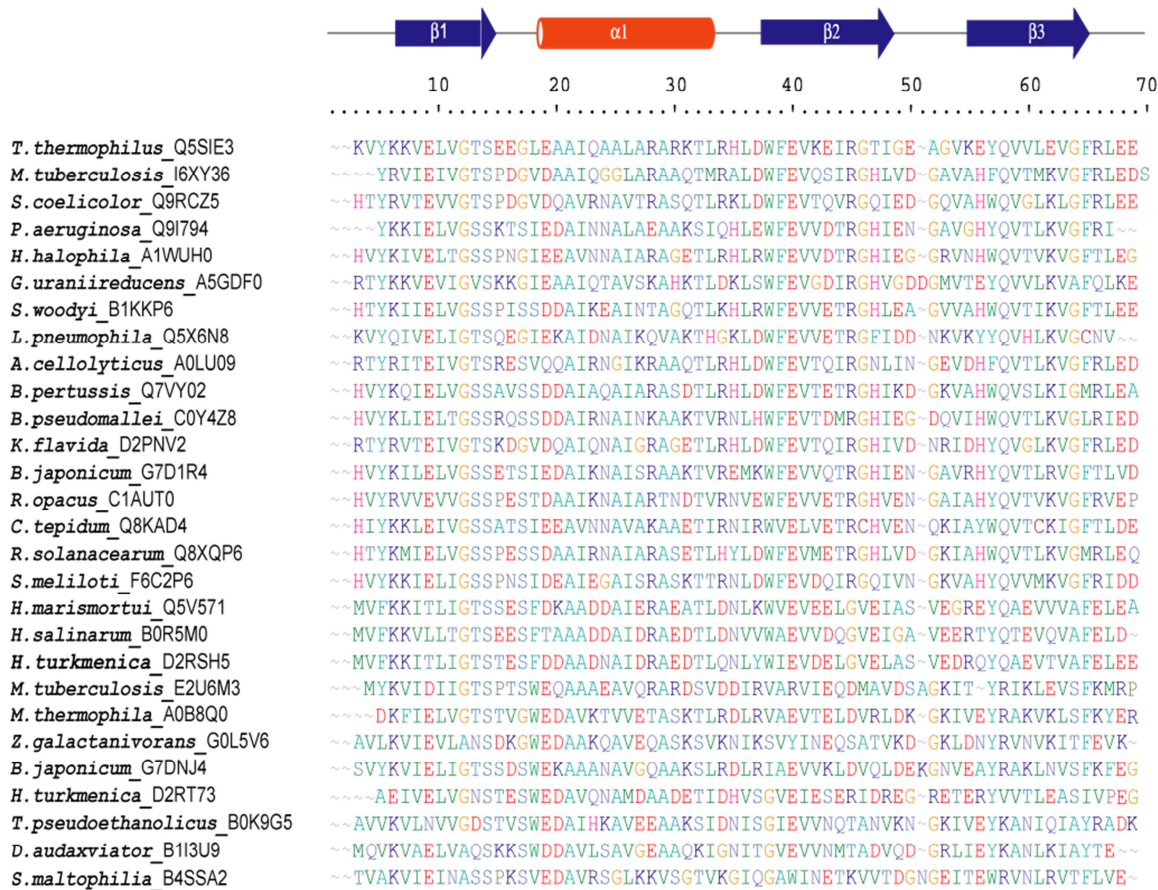


Abb. 58: Dodecinalignment von 28 ausgewählten Dodecinorthologen aus *Thermus thermophilus*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Streptomyces coelicolor*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Halorhodospira halophila*, *Geobacter uraniireducens*, *Shewanella woodyi*, *Leginella pneumophila*, *Acidothermus cellolyticus*, *Bordetella pertussis*, *Burkholderia pseudomallei*, *Kribella flavida*, *Bradyrhizobium japonicum*, *Rhodococcus opacus*, *Chlorobium tepidum*, *Ralstonia solanacearum*, *Sinorhizobium meliloti*, *Haloarcula marismortui*, *Halobacterium salinarum*, *Methanosaeta thermophila*, *Zobellia galactanovorans*, *Haloterrigena turkmenica*, *Thermoanaerobacter pseudoethanolicus*, *Desulfurudis audaxviator* und *Stenotrophomonas maltophilia* mit den dazugehörigen Uniprot-Bezeichnungen. *M. tuberculosis*, *H. turkmenica* und *B. japonicum* enthalten jeweils mehrere Dodecine.

Oberhalb des Alignments sind die Sekundärstrukturelemente des *Thermus thermophilus* Dodecins dargestellt. Die Nummerierung bezieht sich ebenfalls auf die *T. thermophilus* Dodecinsequenz.

4.2 Die Struktur des dodecameren Komplexes

Zum jetzigen Zeitpunkt (Juli 2014) sind die Strukturen von sechs Dodecinen aus fünf verschiedenen Organismen bekannt (Tab. 14). Hierbei handelt es sich um die eubakteriellen Flavin-bindenden Dodecine aus dem thermophilen Organismus *T. thermophilus*, den mesophilen Organismen *M. tuberculosis*, *S. coelicolor* und *H. halophila* sowie dem Archaeobakterium *H. salinarum*. Zwar handelt es sich auch bei *H. halophila* um einen halophilen Organismus, doch ist sein Cytosol osmolytisch so ausbalanciert, dass es einen mesophilen Charakter aufweist [166].

Neben den Strukturen der Flavin-bindenden Dodecine ist auch die Struktur des Calcium-bindenden Dodecins aus *M. tuberculosis* zugänglich.

Tab. 14: Bekannte Dodecinstrukturen

Organismus	Pdb-Eintrag	Auflösung in Å	Ligand	Protein	Referenz
<i>T. thermophilus</i>	2v21	2.4	FMN, CoA		[167]
	2v18	2.6	FMN, CoA		[167]
	2v19	2.6	FMN, CoA	R45A-Mutante	[167]
	2ux9	1.4	FMN, CoA	R65A-Mutante	[167]
	2vyx	1.5	FMN, CoA	W38F-Mutante	
<i>M. tuberculosis</i>	2yiz ^a	1.7	FMN		[168]
	2yj0 ^a	2.4	FMN, CoA	C59 kovalent modifiziert	[168]
	3onr ^a	1.8			[169]
	3oqt ^b	2.9	Calciumion		[164]
<i>S. coelicolor</i>		2.6	FMN, CoA		[147]
<i>H. salinarum</i>	1mog	1.7	Riboflavin		[94]
	2ccc	1.7	Lumiflavin		[124]
	2ccb	1.7	Riboflavin		[124]
	2cc9	1.6	Apoprotein		[124]
	2cc8	1.9	Riboflavin		[124]
	2cc7	1.8	Lumichrom		[124]
	2cc6	1.3	Lumichrom		[124]
	2cjc	1.9	FAD		[170]
	2cif	2.8	FAD		[170]
	2cie	1.8	FAD		[170]
	2vkg	1.8	CF4		[171]
	2vkf	1.7	CF2		[171]
	2vx9	1.7	Riboflavin	E45A-Mutante	[96]
	4b2m	2.0	Riboflavin	W36 ausgetauscht durch 4-Azatryptophan	[172]
	4b2h	1.6	C3F		[172]
<i>H. halophila</i>	4b2k	1.7	Riboflavin	W36 ausgetauscht durch 4-Amino-L-Tryptophan	[173]
	4b2j	1.9	Riboflavin	W36 ausgetauscht durch 4F-Fluorotryptophan	[173]
<i>H. halophila</i>	2vxa	2.6	Riboflavin		[96]

^a hierbei handelt es sich um das vom Gen Rv1498a codierte Dodecin

^b hierbei handelt es sich um das vom Gen Rv0379 codierte Dodecin

PDB-Einträge sind der RCSB-Proteindatenbank [174] entnommen.

CF4=[4-(7,8-dimethyl-2,4-dioxo-3,4-dihydrobenzo[g]pterin-10(2H)-yl)butyl]carbaminsäure

CF2=2'-deoxy-5'-O-{{2-(7,8-dimethyl-2,4-dioxo-3,4-dihydrobenzo[g]pterin-10(2H)-yl)ethyl}carbomoyl}guanosin

C3F=3-[7,8-dimethyl-2,4-dioxo-3,4-dihydrobenzo[g]pterin-10(2H)-yl]propylcarbaminsäure

Die Kristallstrukturen des *T. thermophilus* Dodecins sowie seiner Mutanten wurden durch *molecular replacement* unter Verwendung der Kristallstruktur des *H. salinarum* Dodecins als

Suchmodell (pdb-Eintrag: 1mog) gelöst. Alle Strukturen des *T. thermophilus* Dodecins waren identisch mit r.m.s.d.-Werten von 0.18 bis 0.23 für 67 C α -Atome und zeigen die charakteristische dodecamere Anordnung, bei der die Untereinheiten einen Proteinkomplex mit 23-Punktsymmetrie bilden. Dieser Proteinkomplex bildet eine Hohlkugel mit einem inneren Durchmesser von 23 Å und einem äußeren Durchmesser von 60 Å.

Aufgrund der 23-Punktsymmetrie besitzt der Dodecinkomplex drei zweizählige Achsen, entlang denen jeweils ein FMN-Dimer gebunden ist (siehe Abb. 59 B). Außerdem unterscheidet man zwei Arten von dreizähligen Achsen: In den vier Symmetriestellen I weisen einige Kristallstrukturen die Bindung von sechsfach koordinierten Metallionen auf; in den vier Symmetriestellen II konnte in der *T. thermophilus* Dodecinstruktur die Bindung von CoA-Trimeren beobachten werden (siehe Abb. 59 A).

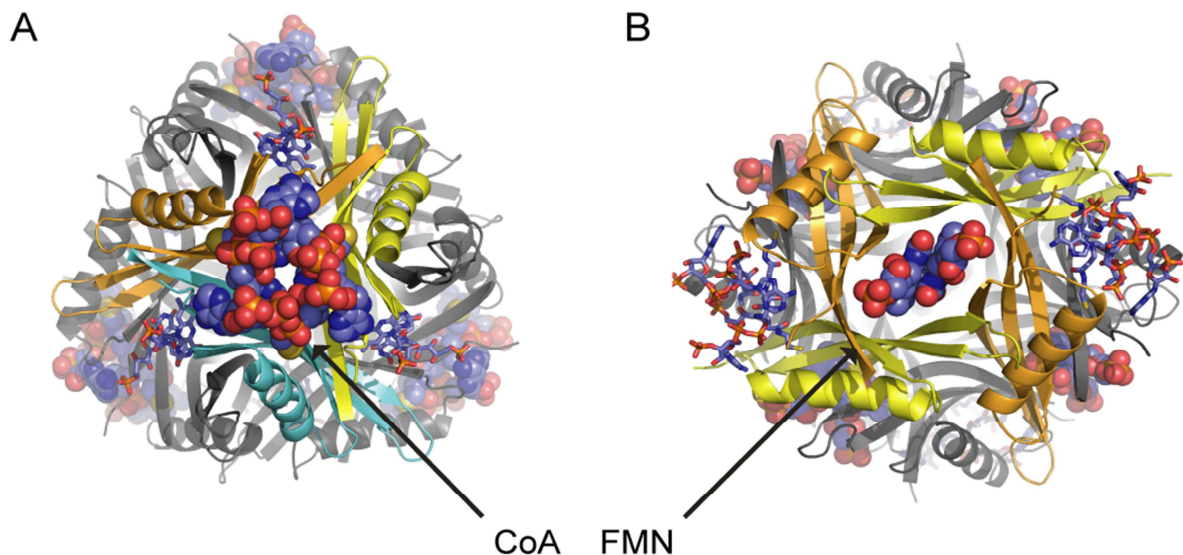


Abb. 59: Quartärstruktur des *T. thermophilus* Dodecins

A: Blick entlang der dreizähligen Achse auf die Quartärstruktur des *T. thermophilus* Dodecins. Die CoA-Trimere sind als Kugeln eingezeichnet, die FMN-Dimere als Stabmodelle. B: Blick entlang der zweizähligen Achse auf die Quartärstruktur des *T. thermophilus* Dodecins. Die FMN-Dimere sind als Kugeln eingezeichnet, die CoA-Trimere als Stabmodell.

4.2.1 Die Monomerfaltung

Die einzelnen monomeren Untereinheiten des *T. thermophilus* Dodecins haben eine Abmessung von 44 x 20 x 17 Å und nehmen eine einfache $\beta_1\alpha_1\beta_2\beta_3$ -Topology an, die charakteristisch für die Dodecinfaltung ist (SCOP-Klassifizierung), siehe Abb. 60 A. Bei dieser Dodecinfaltung ist die α -Helix teilweise von einem dreisträngigen antiparallelen β -

Faltblatt umgeben. Während sich die α -Helix an der Oberfläche des dodecameren Komplexes befindet, kleiden die β -Faltblätter das Innere des Dodecamers aus. Strukturelle Vergleiche mit den anderen bekannten Dodecinstrukturen ergeben eine hohe Strukturkonservierung (siehe Abb. 60 B); so konnte z.B. für das *H. salinarum* Dodecin ein r.m.s.d. Wert von 0.64 Å für 63 C α -Atome ermittelt werden (weitere r.m.s.d.-Werte siehe Abb. 60 B). Größere strukturelle Unterschiede zeigen sich vor allem bei den N- und C-Termini bzw. bei der β_2 - β_3 -Schleife. Hierbei handelt es sich um Bereiche, die sich an der Oberfläche des Dodecamers befinden und in nur geringem Ausmaß an der Kofaktorbindung beteiligt sind.



Abb. 60: Struktur des Dodecin Monomers

A: Stereobild des *T. thermophilus* Monomers als Bändermodell. Zusätzlich eingezeichnet sind hier ausgewählte, an der Flavinbindung beteiligte Aminosäuren. B: Superposition des *T. thermophilus* Dodecins (orange, pdb-Eintrag 2v18) mit den Dodecinen aus *H. salinarum* (grün, pdb-Eintrag 1mog), *H. halophila* (gelb, pdb-Eintrag 2vxa), *M. tuberculosis* (blau, pdb-Eintrag 2yiz) und *S. coelicolor* (rot [147]). Die Superpositionen auf das *T. thermophilus* Dodecin wurden mit PYMOL durchgeführt, hierbei wurden folgende r.m.s.d.-Werte für die Überlagerung von 63 C α -Atomen erhalten: 0.636 Å für das *H. salinarum* Dodecin, 0.352 Å für das *H. halophila* Dodecin, 0.417 Å für das *M. tuberculosis* Dodecin und 0.368 Å für das *S. coelicolor* Dodecin.

Neben den Dodecinen weisen fünf andere Superfamilien (SCOP release 2.04, Juli 2014, [175]) das Dodecinfaltungsmotiv auf. Zu ihnen zählen die N-terminalen Heterodimerisierungsdomänen von RPB7 des RNA-Polymerase II-Komplexes [176], die Kupfer-bindenden Domänen des Alzheimer verursachenden Amyloid Vorläufer Proteins (APP) [50] und die N-terminale Domäne der β -Untereinheit der D-Lysin 5,6-Aminomutase [177]. Das Dodecinfaltungsmotiv tritt außerdem in einer YbjQ-artigen bakteriellen Domäne mit noch unbekannter Funktion (nur pdb-Einträge 1vr4, 1y2i und 2gtc) sowie in YdgH-artigen Proteinen wie etwa der DUF1471-Domäne SssB aus *Salmonella* [178] auf.

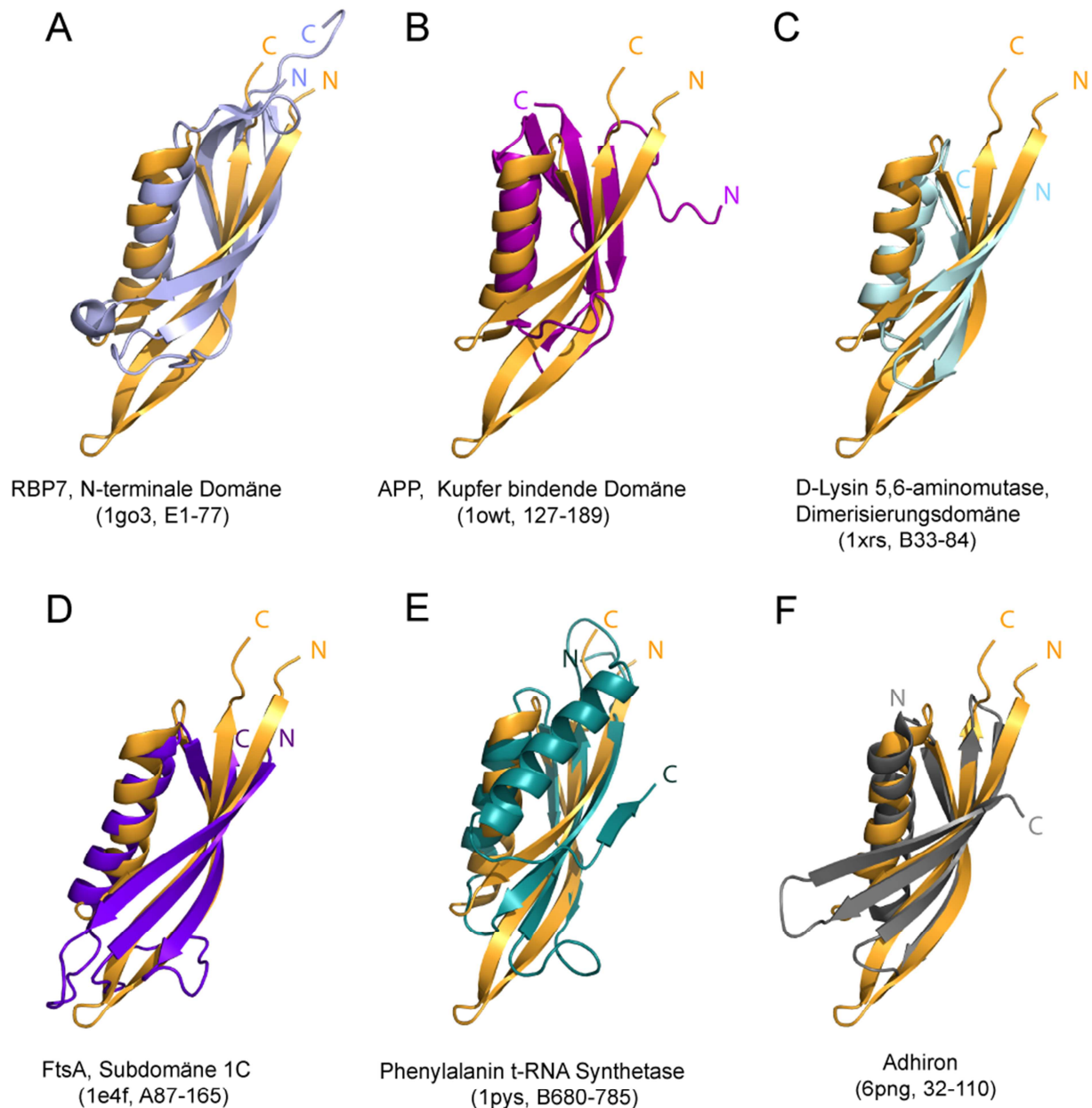


Abb. 61: Vergleich des *T. thermophilus* Dodecins (orange) mit strukturell ähnlichen Proteindomänen

A: Die Superposition der N-terminalen Domäne der RBP7-Untereinheit der archaealen RNA-Polymerase II aus *Methanococcus janaschii* (1go3, E1-77) mit dem *T. thermophilus* Dodecin liefert einen r.m.s.d-Wert von 4.92 Å für 77 C_α-Atome und einen Z-score von 5.0.

B: Die Kupfer bindende Domäne des Alzheimer Amyloid Precursor Proteins (APP) (1owt, 127-189) besitzt ein wesentlich kürzeres β-Faltblatt als das Dodecin. Der r.m.s.d-Wert der Superposition beträgt 4.53 Å für 66 C_α-Atome, der Z-score ist 2.8.

C: Die Superposition der Dimerisierungsdomäne der β-Untereinheit der D-Lysin 5,6-Aminomutase (1xrs, B33-84) aus *Clostridium sticklandii* mit dem Dodecin liefert einen r.m.s.d=4.76 Å für 52 C_α-Atome. Der Z-score beträgt 4.3.

D: Die Subdomäne 1C des Zellteilungsprotein FtsA (1e4f, 87-165) von *Thermotoga maritima* besteht wie das Dodecin aus einem streisträngigen antiparallelen β-Faltblatt benachbart zu einer α-Helix. Der r.m.s.d-Wert der Überlagerung beträgt 3.97 Å für 79 C_α-Atome, der Z-score 5.1.

E: Das Faltungsmotiv der Phenylalanyl-tRNA Synthetase aus *Thermus thermophilus* (1pys, B680-785) weist im Vergleich zum Dodecin eine zusätzliche α-Helix und einen zusätzlichen β-Strang auf und entspricht daher vom Faltungstyp her dem Ferredoxin. Trotzdem wird bei der Superposition der geringe r.m.s.d-Wert von 2.50 Å für 106 C_α-Atome erhalten, der Z-score entspricht 5.2.

F: Das artifizielle Adhiron (4n6t, 32-110) auf Basis der Cystatine weist einen zusätzlichen β -Strang und eine topologische Permutation auf; das Faltungsmotiv lautet hier $\alpha\beta\beta\beta$. Trotz dieses zusätzlichen β -Stranges beträgt der r.m.s.d-Wert der Überlagerung nur 3.59 Å für 79 C $_{\alpha}$ -Atome. Die Superpositionen wurden mit PYMOL erstellt und die verwendeten Koordinaten der RCSB-Datenbank entnommen.

Durch ihre Sekundärstrukturelemente kann man Dodecine außerdem als eine *stand-alone* Version der SHS2-Domänen verstehen [179]. Diese sind allgemein durch ein dreisträngiges β -Faltblatt und eine einzelne α -Helix in der Reihenfolge Sheet-Helix-Sheet₂ definiert [179]. Zu den SHS2-Domänen enthaltenden Proteinen zählen außerdem die Archaeasen, die Cass2-Proteine, GyrI-Proteine, FtsA [180], RPB7-N (s.o.) und SOUL-Proteine (entnommen aus der Pfam-Datenbank [181]). SHS2-Domänen können entweder als *single-copy* Domänen vorliegen (FtsA, RBP7) oder als mehrfache Kopie innerhalb derselben Polypeptidkette (GyrI, Archaeasen) [179].

Datenbanksuchen mit dem DALI-server [182] und der rcsb-Datenbank [174] nach Strukturähnlichkeiten mit der *T. thermophilus* Dodecinstruktur lieferten erwartungsgemäß hohe Übereinstimmungen mit Proteinen der *Dodecin-subunit-like* Superfamilien, aber auch mit SHS2-Domänen-Proteinen wie dem FtsA-Protein oder der Phenylalanyl-tRNA-Synthetase, die eine $(\beta\alpha\beta)_2$ Ferredoxinfaltung aufweist. Interessanterweise werden auch beim Vergleich mit den Multicystatinen und dem auf der Cystatinstruktur basierenden synthetischen Adhiron [183] große Strukturübereinstimmungen erhalten. Hierbei handelt es sich um ein viersträngiges β -Faltblatt und eine einzelne α -Helix mit einem $\alpha\beta\beta\beta$ -Faltungsmotiv (Cystatinfaltung).

4.2.2 Die Stabilisierung der Quartärstruktur

Im *T. thermophilus* Dodecin sind insgesamt 40 % aller Aminosäurereste an der Stabilisierung der Quartärstruktur beteiligt, 42 % der Monomeroberfläche ist durch diese Protein-Protein-Interaktion unzugänglich (2126 Å² von insgesamt 5063 Å²). Ähnlich verhält es sich in den actinobakteriellen Dodecinen. Im Falle des *M. tuberculosis* Dodecins bilden 1942 Å² von 4856 Å² (40 %) die Kontaktfläche zwischen den Monomeren, im *S. coelicolor* Dodecins sind es 1880 Å² von 4756 Å² (39 %). Dies entspricht einer Aminosäurebeteiligung von 44 % an der Oligomerisierung bei *M. tuberculosis* Dodecin bzw. 43 % beim *S. coelicolor* Dodecin.

Die Stabilisierung des dodecameren Komplexes erfolgt in allen Dodecinen zum einen durch ausgedehnte Netzwerke von Wasserstoffbrückenbindungen, zum anderen durch Salzbrücken.

So finden wichtige Protein-Protein-Interaktionen an der Symmetriestelle I statt, an der sich das dreisträngige β -Faltblatt jedes Monomers durch lokale Paarung mit dem β_2 -Strang des benachbarten Monomers zu einem fünfsträngigen antiparallelen β -Faltblatt erweitert. Wechselwirkungen existieren hier vor allem zwischen Aminosäuren D37-V41 (*Mt*: D38-V42, *Sc*: D38-V42) des β_2 -Stranges eines Monomers mit den Resten I44-I48 (*Mt*: I45-L48, *Sc*: V45-I49) des β_2 -Stranges des benachbarten Monomers (siehe Abb. 62 A). Weitere Wechselwirkungen finden an Symmetriestelle II statt: Hier ist das β -Faltblatt durch den ganzen Komplex hindurch durch *main chain-main chain* Wasserstoffbrückenbindungen zwischen G2-K7 (*Mt*: H4-V8, *Sc*: N3-V8) und E9-T13 (*Mt*: E10-T14, *Sc*: E10-T14) des benachbarten Monomers ausgedehnt (siehe Abb. 62 B). Neben der Stabilisierung durch Wasserstoffbrückenbindungen findet eine Interaktion zwischen den einzelnen Monomeruntereinheiten vor allem durch Salzbrücken an der Oberfläche des Dodecamers statt. So stabilisieren beim *T. thermophilus* Dodecin die Salzbrücken R45-E40 und K7-E9 den dodecameren Komplex an der inneren Oberfläche, die Salzbrücken E68-K31 und K3-E55 an der äußeren Oberfläche; im *M. tuberculosis* und im *S. coelicolor* Dodecin tragen die Salzbrücken E41-R46 und E10-K62 analog zur Stabilisierung des Dodecamers bei. Durch Mutation der an den Salzbrücken beteiligten Aminosäuren des *M. tuberculosis* Dodecins konnten Liu *et al.* zeigen [169], dass Salzbrücken einen hohen Anteil an der Stabilität des dodecameren Komplexes besitzen.

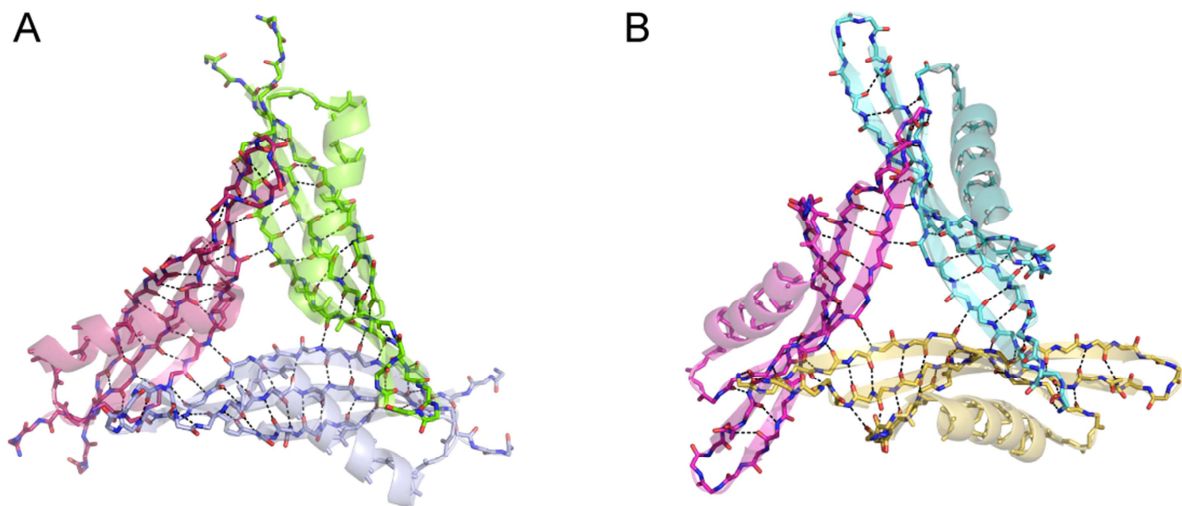


Abb. 62: Wasserstoffbrückennetzwerk zur Stabilisierung des dodecameren Komplexes

Gezeigt sind hier nur die *main chain-main chain* Wasserstoffbrückenbindungen entlang der Symmetrieachse I (A) bzw. Symmetrieachse II (B). Zur besseren Übersicht ist jeweils nur ein Trimer ausgewählt, Sekundärstrukturelemente sind transparent gezeichnet. Wasserstoffbrückenbindungen sind durch schwarze Striche dargestellt.

Um sicherzustellen, dass es sich bei der dodecameren Assemblierung um die biologisch aktive Form und nicht um ein Kristallisationsartefakt handelt, wurde der oligomere Zustand des Dodecins mit verschiedenen Methoden biochemisch charakterisiert. So zeigt das Elutionsprofil der analytischen Gelfiltration des Flavin-rekonstituierten *T. thermophilus* Dodecins einen Hauptpeak, dessen Elutionsvolumen dem Molekulargewicht des dodecameren Dodecins entspricht. Proteinproben mit geringerem Flavinegehalt wie apo-Dodecin bzw. Proben mit nur endogen gebundenem Flavin oder Mutanten mit geringer Flavinaffinität zeigen einen geringeren Dodecamer-, jedoch einen erhöhten Hexameranteil; dieses Gleichgewicht zwischen Dodecamer und Hexamer lässt sich jedoch durch Rekonstituierung mit Flavin zugunsten des Dodecameranteils verschieben, was darauf hinweist, dass durch Flavinylierung eine Stabilisierung des dodecameren Zustandes erfolgt.

SDS-PAGE Analysen des aufgereinigten *T. thermophilus* Dodecins zeigen eine hohe Widerstandskraft gegenüber der Denaturierung durch SDS oder Hitze: Selbst nach 10-minütiger Inkubation bei 95 °C in 4 % SDS enthaltendem Puffer ist neben der dem Monomer entsprechenden Bande bei der SDS-PAGE immer eine Bande zu beobachten, deren apparentes Molekulargewicht dem eines Hexamers entspricht. Ob diese Bande einem teilweise denaturierten Hexamer oder einem nicht-denaturierten Dodecamer zuzuordnen ist, ist unklar. Jedoch führt auch hier eine Flavinylierung der Proteinprobe zu einer Verschiebung des Gleichgewichtes vom monomeren zum oligomeren Zustand.

Anders verhält es sich im *M. tuberculosis* Dodecin. Dieses liegt bereits im annähernd deflavinierten Zustand als Dodecamer vor, wie die Chromatogramme analytischer Gelfiltrationsläufe zeigten. Gemäß der SDS-PAGE-Analyse liegt ein großer Anteil des Proteins auch bei geringer Flavinkonzentration bereits als Oligomer vor (siehe Kapitel 3.2). Eine ähnliche Stabilität des oligomeren Zustandes wird auch für das *S. coelicolor* und das *P. aeruginosa* Dodecin beobachtet (siehe Kapitel 3.3.2 und 3.4.2).

Die Stabilität des dodecameren Komplexes zeigt sich auch bei der CD-Spektroskopie. So verändert sich das Fern-UV-CD-Spektrum des *T. thermophilus* Dodecins bei Erwärmung der Probe auf 95 °C nicht merklich und die Schmelzkurven zeigen keinen sigmoiden Verlauf, der bei einer kooperativen Aufschmelzung der Sekundärstruktur zu erwarten wäre. Interessanterweise hat auch eine Deflavinylierung keine Auswirkung auf die thermische Stabilität, da sowohl beim apo-Dodecin als auch bei der R45A-Mutante, die eine geringere FMN-Affinität zu besitzen scheint, kein Aufschmelzen der Sekundärstrukturen zu beobachten ist.

Eine hohe Thermostabilität mag bei einem Protein aus einem thermophilen Organismus, dessen Temperaturoptimum bei 70 °C liegt, nicht weiter verwunderlich sein. Doch zeigen CD-Spektren der mesophilen Dodecine aus *M. tuberculosis*, *S. coelicolor* und *P. aeruginosa*, dass auch sie bei hohen Temperaturen ihre Sekundärstrukturelemente beibehalten.

Als Ursachen für die Thermophilie von Proteinen wird in der Literatur das Zusammenspiel mehrerer struktureller Faktoren wie z. B. vermehrte Wechselwirkungen von geladenen Resten an der Oberfläche und das Verbergen hydrophober Aminosäuren, eine Erhöhung der Rigidität durch ausgedehnte Sekundärstrukturelemente und kürzere Loops, Oligomerisierung sowie eine besondere Aminosäurezusammensetzung [78, 184, 185] genannt.

Alle diese Faktoren treffen auch auf die Dodecine aus den bislang charakterisierten Organismen zu: Sie kommen alle in der gleichen dodecameren Struktur vor, so dass sie sich im Gehalt der Sekundärstrukturelemente nicht unterscheiden, alle besitzen einen großen Anteil von Sekundärstrukturelementen und nur kurze ungeordnete Bereiche. Geladene Aminosäuren kommen ausschließlich auf den äußeren und inneren Oberflächen vor, und unzugängliche Bereiche enthalten nur kleinere unpolare AS. Auch unterscheiden sie sich nicht wesentlich in der Anzahl der den dodecameren Komplex stabilisierenden Wechselwirkungen. Am meisten Wechselwirkungen finden sich im *T. thermophilus* Dodecin mit 15 Wasserstoffbrückenbindungen und 4 Salzbrücken, am wenigsten im *H. halophila* Dodecin mit 10 Wasserstoffbrückenbindungen und 2 Salzbrücken (*Mt*:14 H-Brücken, 2 Salzbrücken, *Sc*:13 H-Brücken, 3 Salzbrücken, *Hs*:11 H-Brücken, 4 Salzbrücken).

Beim genaueren Vergleich der Dodecine lässt sich feststellen, dass sich durch die Adaption an den jeweiligen Lebensraum die Aminosäurezusammensetzungen unterscheiden (siehe Anhang 9), ohne dass dadurch die thermische Stabilität wesentlich beeinflusst zu sein scheint. So weist das Dodecin aus dem thermophilen *T. thermophilus* einen hohen Anteil an Lysinresten auf, die durch ihre Flexibilität günstig für die thermische Beweglichkeit sind [186]. Strukturell ungünstig sind dagegen Histidinreste und die unpolaren Aminosäuren Prolin, Serin und Threonin, da sie keine elektrostatischen Wechselwirkungen eingehen können [185], ihr Anteil ist daher im *T. thermophilus* Dodecin im Vergleich zu den anderen Dodecinen herabgesetzt.

Wie für halophile Proteine üblich [187], besitzt das *H. salinarum* Dodecin einen hohen Anteil an den sauren Aminosäuren Aspartat und Glutamat (23 % im Vergleich zu 17 % im *T. thermophilus* Dodecin), die zur Stabilisierung der Hydrathülle um das Protein notwendig

sind [94]. Das ebenfalls halophile *H. halophila* Dodecin besitzt dagegen eine nur geringe Anzahl saurer Aminosäuren (13 %), da im *H. halophila* das Cytosol einen typisch mesophilen Charakter aufweist.

4.3 Die Flavinbindung

4.3.1 Die Identifizierung des gebundenen Flavinkofaktors

Anhand von UV-VIS-Spektren, die die für oxidierte Flavine typischen Absorptionsmaxima bei 451 und 374 nm aufwiesen, konnte nachgewiesen werden, dass es sich bei dem im *T. thermophilus* Dodecin gebundenen Kofaktor um ein Flavin im oxidierten Zustand handelt. Auch Fluoreszenzemissionsspektren zeigten die für oxidierte Flavine typische Emission bei 530 nm. Analoge Ergebnisse konnten für das *M. tuberculosis*, *S. coelicolor* und das *P. aeruginosa* Dodecin erhalten werden. Eine nähere Charakterisierung eines Kofaktorextraktes per ESI-MS zeigte durch Vergleich mit Riboflavin-, FMN- und FAD-Standards, dass das heterolog exprimierte *T. thermophilus* Dodecin hauptsächlich den Flavinkofaktor FMN als endogenen Kofaktor besitzt. Ebenfalls detektiertes Riboflavin ist wahrscheinlich auf Hydrolyse des Kofaktors bei der Analyse zurückzuführen, da auch der FMN-Standard geringe Mengen an Riboflavin aufwies. FMN konnte ebenfalls als endogen gebundener Kofaktor für das *M. tuberculosis* Dodecin identifiziert werden, während Kofaktorextrakte des *S. coelicolor* und *P. aeruginosa* Dodecins neben FMN auch FAD als Kofaktoren aufwiesen.

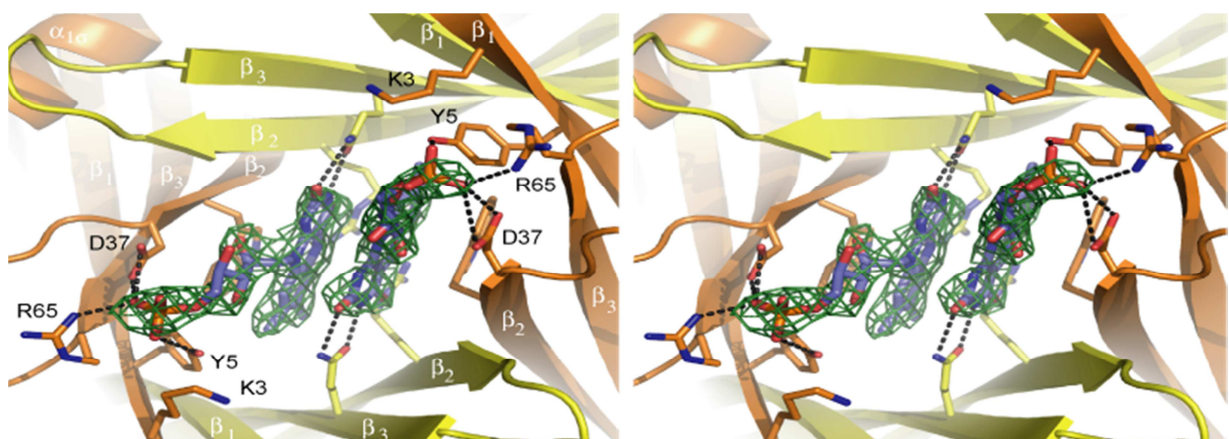


Abb. 63: Stereodiagramm der $2F_{\text{obs}}-F_{\text{calc}}$ -Elektronendichtekarte des *T. thermophilus* Dodecins bei 2.6 Å Auflösung entlang der zweizähligen Achse auf die FMN-Bindungsstelle

Die $2F_{\text{obs}}-F_{\text{calc}}$ -Elektronendichtekarte (Konturierungslevel 1.5σ) ist in grün dargestellt; Interaktionen zwischen den FMN-Molekülen und den an der Bindung beteiligten Aminosäureresten sind schwarz gepunktet eingezeichnet.

Ebenso zeigte die $2F_{\text{obs}}-F_{\text{calc}}$ -Elektronendichte des *T. thermophilus* Dodecins mit endogen gebundenen Kofaktoren, die als *simulated annealing omit electron density map* ohne Berücksichtigung eines modellierten FMN-Dimers berechnet wurde, um etwaigen Modelbias zu verhindern, die Anwesenheit von FMN an (siehe Abb. 63).

4.3.2 Die Flavinbindung in eubakteriellen W-Typ Dodecinen

Wie die Kristallstrukturen der Dodecine aus *T. thermophilus*, *M. tuberculosis* und *S. coelicolor* zeigen, unterscheiden sich die bislang untersuchten eubakteriellen Dodecine strukturell nur geringfügig in der Art der Flavinbindung, so dass im folgenden Abschnitt bei der Beschreibung der Flavinbindung im *T. thermophilus* Dodecin vergleichend auch die Strukturen des *M. tuberculosis* und *S. coelicolor* Dodecins betrachtet werden.

Interessanterweise sind in den Dodecinen nur wenige konservierte Reste an der Bindung des Flavindimers beteiligt (siehe Abb. 63 und Abb. 64). Wie bei Flavoproteinen üblich, ist der Dimethylbenzolring vorrangig durch hydrophobe Reste umgeben, wohingegen der Nukleotidanteil durch Wasserstoffbrückenbindungen zu den benachbarten polaren Aminosäuren stabilisiert wird. So wird der Dimethylbenzolring im *T. thermophilus* Dodecin durch die Aminosäurereste V11 und V59 stabilisiert (*Mt*: V12 und I 60; *Sc*: V12 und G60), die in der Abbildung aus Gründen der Übersicht nicht dargestellt sind. Hingegen wird der Nukleotidanteil durch die Seitenketten der Aminosäuren Q57 und R45 (bzw. Q58 und R46 in *Mt* und *Sc* Dodecin) durch die Ausbildung von gleich vier Wasserstoffbrückenbindungen gebunden: Bei der Aminosäure Q57 handelt es sich um einen hochkonservierten Rest, der in allen W-Typ Dodecinen vorhanden ist und der Wasserstoffbrücken zu C2=O und N3-H ausbildet. Diese Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem apo-Protein und dem N3-H des Flavinkofaktors ist ein universeller Aspekt von Flavoenzymstrukturen [188]. Zwar handelt es sich meist bei den Wasserstoffakzeptoren um Hauptketten-Carbonylgruppen, jedoch kann auch wie im Flavodoxin [189] oder wie bei den Dodecinen eine polare Seitenkette involviert sein. Interessanterweise ist in nicht-W-Typ Dodecinen an dieser Stelle eine basische Aminosäure (R, K) zu finden. R45, der das Flavin durch die Ausbildung einer Wasserstoffbrücke zu C4=O und N5 stabilisiert, ist in allen eubakteriellen Dodecinen vom W-Typ konserviert, wohingegen archaebakterielle Dodecine an dieser Position einen Glycinrest aufweisen.

Den weitaus größten Effekt auf die Bindung des Flavins haben jedoch die Indolgruppen der hochkonservierten Tryptophanreste (W38 im *T. thermophilus* Dodecin, W39 im *Mt* und *Sc* Dodecin) des W-Typs, die von zwei symmetrieverwandten Untereinheiten beige-steuert

werden. Diese Reste stabilisieren den Isoalloxazinring durch π - π Stapelwechselwirkung und die Ausbildung einer sandwichartigen aromatischen Tetrade. Die Bindung des Isoalloxazinrings durch Ausbildung von π - π -Stapeln ist auch von anderen Flavoproteinen bekannt: Sowohl in Flavodoxinen als auch im RfBP ist das Flavin durch die Ausbildung einer aromatischen Triade stabilisiert, in der das Flavin von jeweils einem Tryptophan und einem Tyrosinrest sandwichartig umgeben ist [21, 47].

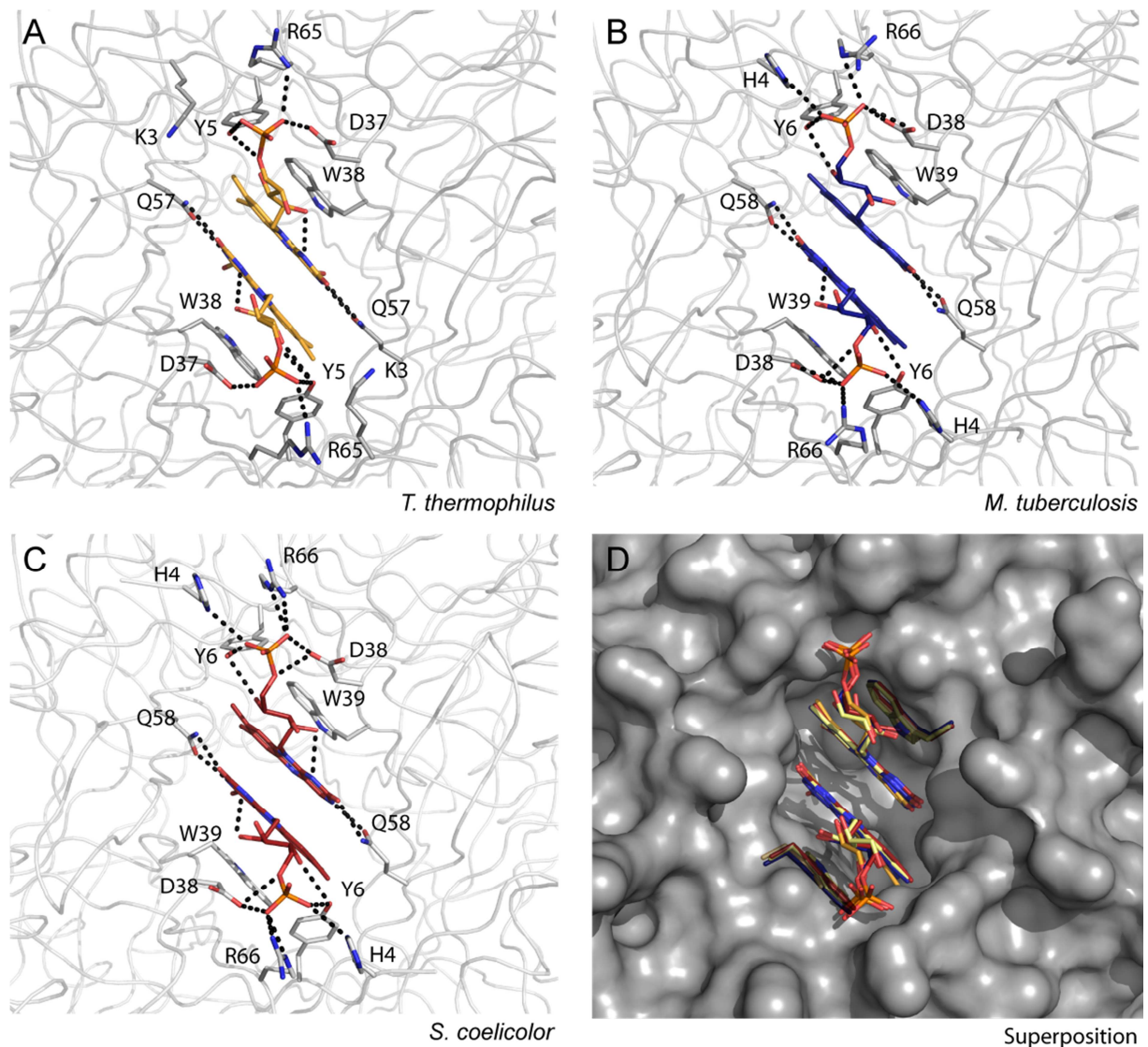


Abb. 64: Flavinbindung in eubakteriellen Dodecinen

Dargestellt ist hier die FMN-Bindung in den Dodecinen aus *T. thermophilus* (A), *M. tuberculosis* (B) und *S. coelicolor* (C) [147]. Hervorgehoben sind wichtige Aminosäurereste, die an der FMN-Bindung beteiligt sind; eingezeichnet sind außerdem polare Wechselwirkungen zwischen Protein und Flavin sowie stabilisierende Wechselwirkungen innerhalb des Flavins. Zusätzlich dargestellt ist eine Superposition der aromatischen Tetraden der Dodecine aus *T. thermophilus* (orange), *M. tuberculosis* (blau), *S. coelicolor* (rot) und *H. halophila* (gelb, pdb-Eintrag 2vxa) und ihre Lage in der Flavinbindungstasche (D). Die Proteinoberfläche entspricht der des *T. thermophilus* Dodecins. Die Nummerierung der Aminosäuren erfolgte anhand des Uniprot-Eintrags.

Die Stabilisierung der Ribitylseitenkette des Flavinkofaktors erfolgt in allen Dodecinen durch die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen. Zum einen wird eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen der 2'OH-Gruppe und dem Hauptketten-Carbonyl des Restes D37 im *T. thermophilus*, bzw. D38 im *M. tuberculosis* und *S. coelicolor* Dodecin ausgebildet, zum anderen wird die 3'OH-Gruppe des Ribityls von der Seitenkette des W-Typ-spezifischen Y5-Restes (*Tth* Dodecin) bzw. Y6 (*Mt* und *Sc* Dodecin) gebunden. In allen drei Dodecinen findet außerdem durch eine intramolekulare Wasserstoffbrückenbindung zwischen der 2'OH-Gruppe und dem N1-Atom des Isoalloxazinrings eine Stabilisierung statt.

Der Phosphatanteil des FMNs wird durch die Ausbildung von Salzbrücken zwischen den Sauerstoffatomen des Phosphatrestes und den Aminosäureseitenketten K3, Y5, D37 und R65 des thermophilen Dodecins gebunden. Bei den Dodecinen aus *M. tuberculosis* und *S. coelicolor* handelt es sich analog um die Reste Y6, D38 und R66; der positiv geladene Rest K3 des *T. thermophilus* Dodecins ist hier durch die homologe Aminosäure H4 ausgetauscht.

4.3.3 Vergleich zwischen eubakterieller und archaebakterieller Flavinbindung

Obwohl Struktur und Flavinbindung auf den ersten Blick in den eubakteriellen W-Typ-Dodecinen und dem Archaeon *H. salinarum* sehr ähnlich zu sein scheinen, unterscheiden sie sich signifikant in der Art der Flavinbindung. Während in eubakteriellen Dodecinen vorrangig FMN als endogen gebundener Kofaktor nachgewiesen werden konnte, zeigt die Kristallstruktur des *H. salinarum* Dodecins nach der partiellen Aufreinigung aus dem halobakteriellen Cytosol zunächst ausschließlich die Anwesenheit von Riboflavin [94]. Genauere spektroskopische und strukturelle Analysen solcher *shot gun* Kristalle legen jedoch nahe, dass es sich bei dem gebundenen Kofaktor um eine Mischung aus Riboflavin, Lumiflavin und Lumichrom handelt [124]. Für die Bindung unterschiedlicher Flavinspezies schien zunächst der Rest R65 im *T. thermophilus* Dodecin verantwortlich zu sein, der dort eine Salzbrücke zum Phosphatrest des FMNs ausbildet und im *H. salinarum* Dodecin aufgrund der halophilen Adaption durch einen negativ geladenen Glutamatrest substituiert ist. Doch zeigte die strukturelle und biochemische Charakterisierung einer *Tth*-R65A-Mutante keinen Einfluss auf die Art des gebundenen Kofaktors (siehe Abb. 65).

Neben der Art des gebundenen Kofaktors unterscheiden sich das *T. thermophilus* Dodecin und das *H. salinarum* Dodecin jedoch auch in der Stereochemie und der Orientierung der aromatischen Tetraden: Im Gegensatz zum *H. salinarum* Dodecin, in dem sich die Isoalloxazinringe mit ihren *re*-Seiten gegenüberstehen, wenden sich im *T. thermophilus* Dodecin die Isoalloxazinringe ihre *si*-Seiten zu, wodurch unpolare und polare

Bindungstaschen im Vergleich zum *H. salinarum* Dodecin vertauscht sind. Interessanterweise hat dieser inverse Bindungsmodus nur geringe Auswirkung auf die Konformation der an der Flavinbindung beteiligten Aminosäurereste.

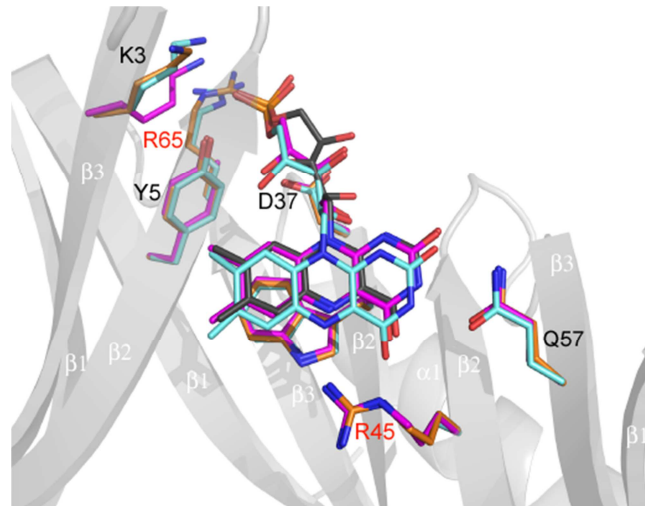


Abb. 65: Superposition des *T. thermophilus* Wildtyp Dodecins mit der R45A- und der R65A-Mutante

Das Wildtyp Dodecin ist in grau und orange coloriert, die R45A-Mutante in cyan und die R65A-Mutante in magenta. Mutierte Aminosäuren sind rot beschriftet. Für eine bessere Übersicht ist nur ein Molekül des FMN-Dimers gezeigt und zwei Monomere vor der Bindungsstelle wurden aus der Abbildung entfernt.

Am deutlichsten wird dies bei der Aminosäure Q57: Obwohl dieser Rest durch die Umkehrung der Bindungstaschen nicht-äquivalente Flavinmonomere bindet, ist er in beiden Dodecinen an der Bindung des Pyrimidinanteils des Flavins beteiligt.

Für die unterschiedliche Orientierung der aromatischen Tetraden schienen zunächst die Aminosäuren an der Position 45 verantwortlich zu sein: Im *H. salinarum* Dodecin überbrückt ein Magnesium-Ion den in archaebakteriellen Dodecinen hochkonservierten Rest E45 mit dem C4-Carbonyl und der N5-Gruppe des Isoalloxazinring, während im *T. thermophilus* Dodecin diese beiden Gruppen mit dem Aminosäurerest R45 zwei Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden. Dieser R45-Rest ist hochkonserviert in den eubakteriellen Dodecinen vom W-Typ, während archaebakterielle Dodecine im Sequenzalignment an dieser Position einen Glycinrest (G43) aufweisen. Hierbei scheint dem überbrückenden Magnesiumion eine besondere Bedeutung zuzukommen, denn eine alleinige Substitution des R45-Restes führt noch nicht zu einer Umkehrung des Bindungsmodus. So weist die Röntgenkristallstruktur der *T. thermophilus* R45A-Mutante dieselbe *si-si*-Orientierung wie das WT Dodecin auf (siehe Abb. 65). Oesterhelt *et al.* sehen die Ursache für

den unterschiedlichen Bindungsmodus (*si-si* vs. *re-re*) in einer Verengung der Bindungstasche in den eubakteriellen W-Typ-Dodecinen [96].

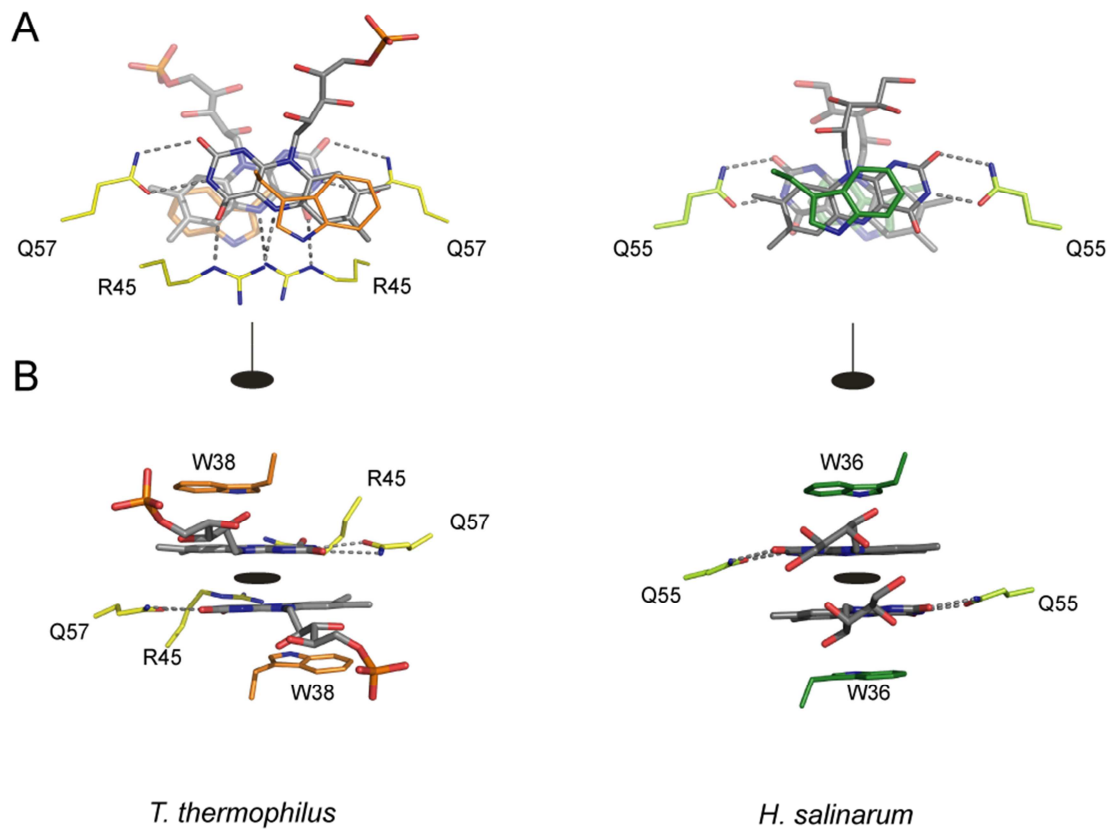


Abb. 66: Schematische Darstellung der aromatischen Tetraden im *T. thermophilus* Dodecin (links) und im *H. salinarum* Dodecin (rechts)

Flavindimere sind in grau gezeichnet, interagierende Aminosäurereste sind in orange für das *T. thermophilus* Dodecin und in grün für das *H. salinarum* Dodecin (pdb-Eintrag 1mog) gezeigt. Als grau gepunktete Linien sind außerdem die Wasserstoffbrückenbindungen vom Aminosäurerest Q57/Q55 und R45 zum Nukleotidanteil des FMN dargestellt. Für Abb. B ist Abb. A um 90 ° nach vorn gedreht worden.

Auch die Überlappung der aromatischen Tetraden ist in beiden Dodecinstrukturen unterschiedlich: Während im *H. salinarum* Dodecin eine große Überlappung aller vier π -Systeme stattfindet, ist diese Überlappung im *T. thermophilus* Dodecin deutlich verringert (siehe Abb. 66 A). Hier sind die Kontaktflächen der Isoalloxazinringe mit 85.0 \AA^2 20 % kleiner als im *H. salinarum* Dodecin mit einer Kontaktfläche von 106.2 \AA^2 . Diese große Überlappung im *H. salinarum* Dodecin geht einher mit einer annähernd parallelen Anordnung der Ribitylseitenketten, die zusätzliche Stabilisierung durch intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den symmetrieverwandten 3'- und 5'-Hydroxylgruppen erlaubt. Im *T. thermophilus* Dodecin, in dem die Abweichung zwischen den beiden Flavinen mit 32° größer ist als im *H. salinarum* Dodecin mit -27° (berechnet für die

relative Orientierung der Achsen durch das N5- und N10-Atom des Isoalloxazins), weisen die Ribitylseitenketten in entgegengesetzte Richtungen, was zu einer geringeren intermolekularen Stabilisierung zwischen den Flavindimeren führt.

4.3.4 Spektroskopische und Redox-Eigenschaften der Flavinbindung

Durch die Bindung der Flavinkofaktoren an das apo-Dodecin ändern sich deren spektroskopischen Eigenschaften, die Rückschlüsse auf die Art der Bindung und die Wechselwirkungen zwischen apo-Dodecin und Flavin aber auch zwischen den Flavinen untereinander zulassen.

Beispielsweise weisen UV-VIS-Spektren des *T. thermophilus* Dodecins eine Rotverschiebung des $S_0 \rightarrow S_1$ Übergangs von 445 nm für freies FMN auf 451 nm für den FMN-Dodecin-Komplex auf. Außerdem besitzen die Spektren Schultern im Bereich um 420 und 480 nm, die auf eine Schwingungs-Feinstruktur aufgrund von Wechselwirkung mit einer hydrophoben Proteinumgebung zurückzuführen sind und auch bei anderen Flavoproteinen, wie etwa dem Riboflavintransporter RibU beobachtet werden können [190]. Zusätzlich ist ein signifikanter *red tail* zwischen 520 und 600 nm zu beobachten, der nur im WT-Dodecin, jedoch nicht in seinen W38Y und W38F-Mutanten auftritt. Ein solcher *red tail* wurde kürzlich auch beim Lumazin beobachtet und einem Tryptophan-Flavin Charge-Transfer-Komplex zugeordnet (Michel-Beyerle, unveröffentlichte Ergebnisse). In UV-VIS-Spektren des *M. tuberculosis*, *S. coelicolor* und *P. aeruginosa* Dodecin treten diese Unterschiede zwischen freiem und Dodecin-gebundenem FMN nicht so deutlich hervor; das Absorptionssmaximum des $S_0 \rightarrow S_1$ -Übergangs ist kaum bathochrom verschoben und auch die Schultern im Bereich um 420 und 480 nm nicht sichtbar. Hinweise auf eine Bindung geben lediglich die bathochrome Verschiebung der Absorption des $S_0 \rightarrow S_1$ -Übergangs sowie der *red tail* zwischen 520 und 600 nm. Ursächlich hierfür scheint eine geringere Bindungsaffinität und demzufolge höhere FMN-Freisetzung zu sein, die zu einer Überlagerung der Absorptionen von freiem und Dodecin-gebundenem FMN führt [147].

Auch UV-VIS-CD-Spektren des *T. thermophilus* Dodecins geben einen deutlichen Hinweis auf die Interaktion zwischen Flavin und apo-Dodecin: Während FMN im nahen UV- und sichtbaren Bereich optisch vollkommen inaktiv ist, weist der stöchiometrische Komplex Elliptizitätsextrema bei 282 nm, 354 nm, 392 nm und 509 nm auf, die nicht durch Addition von Spektren von freiem FMN und apo-Dodecin erhalten werden können und demzufolge auf die Bindung des Flavinkofaktors an das apo-Dodecin zurückzuführen sind. Die im Vergleich

zu apo-Dodecin erhöhte Elliptizität bei 268 nm ist typisch für *stacking*-Interaktionen [149] und wird z.B. auch beim Flavocytochrom b_2 [191] oder dem RfBP [192] beobachtet, bei denen das Flavin zwischen zwei aromatischen Aminosäuren sandwichartig gebunden ist.

Fluoreszenzspektren des *T. thermophilus* Dodecins zeigen neben einer geringen bathochromen Verschiebung des Emissionsmaximums eine um mehr als 98 % verringerte Fluoreszenzemission im Vergleich zu freiem Flavin aufgrund der π -*stacking*-Interaktion des Isoalloxazinrings mit dem benachbarten Tryptophanrest. Ein ähnlich ausgeprägter Fluoreszenzquench ist auch bei RfBP (85 % Fluoreszenzquench) [192] und beim Riboflavintransporter RibU (94 % Fluoreszenzquench) [190] zu beobachten. Dieser Fluoreszenzquench ist in der W38Y und W48F-Mutante lediglich in abgeschwächter Form zu beobachten. Die Fluoreszenz verringert sich hier nur auf 20 % (W38Y) bzw. 30 % (W38F) Restfluoreszenz im Vergleich zur Emission des freien Flavins, so dass hier eine schwächere Interaktion zwischen Flavin und benachbarter aromatischer Aminosäure zu vermuten ist.

Zeitaufgelöste Fluoreszenzspektren, die bei 540 nm für das WT Dodecin als auch für die W38Y und W38F-Mutante aufgenommen wurden, zeigen, dass die Dauer des angeregten Flavin Zustandes beim WT Dodecin nur 70 fs beträgt und sich damit nahe der Grenze des messbaren Bereichs befindet. Ein wenig länger ist die Lebensdauer des angeregten Zustandes der W38Y-Mutante ($\tau=0.3$ ps), während ein dramatischer Anstieg bei der W38F-Mutante zu erkennen ist ($\tau=2.2$ ns) (Michel-Beyerle persönliche Mitteilung).

Neben den spektroskopischen Eigenschaften wird auch das Redoxverhalten durch die π -*stacking*-Wechselwirkungen stark beeinflusst. Während freie Flavine ein Redoxpotential von etwa -200 mV besitzen und sich unter anaeroben Bedingungen mit üblichen Redoxmitteln reduzieren lassen, gelang die anaerobe Reduktion des *T. thermophilus* Dodecins mit 5'-Deazaflavin, EDTA, DTT und Natriumdithionit nicht. Erst durch Reduktion mit Titan(III)citrat, das ein Redoxpotential von -480 mV besitzt [150], konnte nach Durchlaufen des Semiquinonzustandes der vollkommen reduzierte Zustand erreicht werden. Interessanterweise lässt sich das *H. salinarum* Dodecin leicht mit EDTA oder Natriumdithionit reduzieren [171, 193], was sich eventuell auf den leicht veränderten Bindungsmodus zurückführen lässt.

Auch Triplettsspektren des *T. thermophilus* Dodecins konnten weder vom WT Dodecin noch von der W38Y Mutante erhalten werden, da die Relaxation vom angeregten Zustand in den Grundzustand ultraschnell erfolgt, so dass sie außerhalb der Zeitskala des *Intersystem-Crossing* liegt, was in Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus den zeitaufgelösten Fluoreszenzmessungen ist. Allein die W38F-Mutante liefert ein detektierbares Triplettssignal,

dessen Parameter starke Ähnlichkeit mit denen von neutralem FMN in Lösung aufweist. Dies lässt darauf schließen, dass bei der Mutation des Tryptophanrestes zum Phenylalaninrest eine starke Destabilisierung der elektronischen Interaktion zwischen Kofaktor und aromatischer Aminosäure stattfindet, die eine langsamere Deaktivierung des angeregten Flavins und somit das Auftreten eines Triplettzustandes zur Folge hat.

Continuous-wave und gepulste ENDOR-Spektren des mit Titan(III)citrat erzeugten Semiquinons lassen darauf schließen, dass es sich bei dem Semiquinon um ein anionisches, nicht delokalisiertes Radikal handelt und dementsprechend die Kopplung zwischen den beiden Flavinmonomeren sehr gering ist. Die auf diese Weise gemessene geringe Kopplung zwischen den beiden Flavinmonomeren konnte auch durch Rechnungen von Alexander Voityuk basierend auf quantenchemischen Berechnungen bestätigt werden (Alexander Voityuk, unveröffentlichte Ergebnisse).

4.3.5 Spezifität und Zeitabhängigkeit der Flavinbindung

Der aufgereinigte *T. thermophilus* Dodecinkomplex weist ein Protein:Kofaktor-Verhältnis von 1:0.2 auf, das höchstwahrscheinlich auf einen Mangel an freiem Flavin im *E. coli* Cytosol während der heterologen Expression zurückzuführen ist und auf die Bindung nur eines Flavindimers pro Dodecamer hindeutet. Während der Aufreinigung kann der Komplex jedoch *in vitro* mit Riboflavin, FMN oder FAD rekonstituiert werden. Nach der Abtrennung von überschüssigem Flavin durch Größenausschlusschromatographie betragen die berechneten Protein:Kofaktor-Verhältnisse in allen Fällen 1:1.2, so dass angesichts der systematischen Fehler insbesondere bei der Bestimmung absoluter Proteinkonzentrationen von einem stöchiometrischen Dodecin:Flavin-Komplex auszugehen ist. Anders verhält es sich im *H. salinarum* Dodecin: während auch hier Riboflavin und FMN in stöchiometrischen Mengen gebunden werden, wurde für FAD ein Protein:Kofaktor-Verhältnis von 1:0.5 erhalten. Ursächlich hierfür ist die Bindung des FADs in einer *closed* Konformation, die nur die Bindung von sechs FAD-Molekülen zulässt [170].

Die Bindungsaffinität zwischen Flavinkofaktor und dem *T. thermophilus* Dodecin in der apo-Form wurde zum einen durch Fluoreszenztitration als auch durch ITC-Messungen bestimmt. Zur Bestimmung der Bindungsaffinität durch Fluoreszenztitration wurde die Fluoreszenzemission nach einer Excitation bei 450 nm gemessen. Dabei wird ausgenutzt, dass bei der Bindung von Flavinen an das apo-Dodecin ein fast vollständiger Fluoreszenzquench stattfindet. Titrationsexperimente, bei denen alle 5 min apo-Dodecin in eine FMN-Lösung injiziert wurde, wiesen eine Bindungskurve auf, die nicht nach einem 1:1 Bindungsmodell

gefittet werden konnte. Daraufhin wurden zeitabhängige Messungen durchgeführt, bei denen die Abnahme der Fluoreszenz nach nur einer einzigen Injektion detektiert wurde. Diese zeigten, dass ein vollständiger Fluoreszenzquench mehrere Stunden benötigt. Durch Erhöhung der Temperatur von 20 °C auf 37, 50 und 65 °C lässt sich die Fluoreszenzabnahme beschleunigen, was darauf hindeutet, dass sich das Bindungsgleichgewicht bei höheren Temperaturen schneller einstellt. Auf diese Weise konnten Halbwertszeiten von 166 min (20 °C), 86 min (37 °C), 41 min (50 °C) und 25 min (65 °C) bestimmt werden. Ein Arrhenius-Plot lieferte schließlich für die Bindung von FMN an das apo-Dodecin eine Aktivierungsenergie von 35.6 kJ/mol.

Im Vergleich hierzu konnten ITC-Experimente, bei denen Portionen einer FMN-Lösung alle 5 min zur apo-*T. thermophilus* Dodecinlösung injiziert wurden, nach einem 1:1 Bindungsmodell gefittet werden. Auf diese Weise konnte eine moderate Dissoziationskonstante von 0.92 µM und eine Bindungsstöchiometrie von nur 15 % ermittelt werden. Dies weist darauf hin, dass bei dieser Methode nur die Bindung eines von 6 Flavindimeren an das apo-Dodecin gemessen werden kann. Vermutlich führt die Bindung des ersten Dimers zu einer kinetischen Hemmung und zu nicht vernachlässigbaren Konformationsänderungen innerhalb des Dodecinkomplexes (siehe Abb. 67).

Eine solche kinetische Hemmung scheint beim *S. coelicolor* Dodecin in noch größerem Ausmaße vorzuliegen, hier zeigten Fluoreszenztitrationen, dass für die Einstellung des Gleichgewichts nach jeder Injektion mehrere Stunden verstrichen. Die Bildung des FMN-*Mt*-Dodecinkomplexes weist jedoch eine zum *Tth* Dodecin stark verkürzte Halbwertszeit von nur 5 min auf [147].

Um die Bindung der restlichen fünf Flavindimere an das *T. thermophilus* Dodecin zu untersuchen, wurden für Fluoreszenztitrationen Dodecinproben verwendet, die bereits 20 % endogenes Flavin gebunden hatten. Bei diesen Proben wurde keine Zeitabhängigkeit mehr beobachtet, so dass die Bindungskurven nach einem 1:1 Bindungsmodell gefittet werden konnten. Auf diese Weise wurde ein apparenter K_D von 0.311 µM für die Bindungsaffinität zwischen FMN und apo-Dodecin erhalten. Neben FMN wurden außerdem die Bindungsaffinitäten von Riboflavin und FAD als auch die von Lumiflavin und Lumichrom bestimmt. Alle Flavine wiesen ähnliche Dissoziationskonstanten auf, die von 589 nM für FAD, über 311 nM für FMN und 233 nM für Riboflavin zu 141 nM für Lumiflavin und 80 nM für Lumichrom reichten, so dass mit abnehmender Flavingröße eine Zunahme der Bindungsaffinität beobachtet werden konnte.



Abb. 67: Modell zur Flavinbindung in eubakteriellen W-Typ Dodecinen

Nach einer schnellen Bindung des ersten Dimers (beobachtet durch ITC) mit einer Dissoziationskonstanten von $0.92 \mu\text{M}$ findet vermutlich eine Konformationsänderung statt. Ist diese erfolgt, können in einer raschen Folgereaktion weitere Flavin-Dimere (gezeigt in orange) mit einer Dissoziationskonstanten von $0.31 \mu\text{M}$ (beobachtet mittels Fluoreszenztitration) gebunden werden. Zur besseren Ansicht sind hier nur drei statt der vorhandenen sechs Bindungstaschen gezeigt.

Im Gegensatz hierzu zeigt das *H. salinarum* Dodecin deutlich niedrigere Dissoziationskonstanten für die kleinen Flavine Lumichrom (11.6 nM), Lumiflavin (17.6 nM) und Riboflavin (35.8 nM) als für die großen Flavonukleotide FMN ($11.3 \mu\text{M}$) und FAD (440 nM) [124]. Auch hier ist mit zunehmender Größe eine Abnahme der Bindungsaffinität zu beobachten. Dass sich der Kofaktor FAD falsch in der Reihe einordnet, ist vermutlich auf den für FAD veränderten Bindungsmodus in der geschlossenen Konformation und das daraus resultierende Dodecin:FAD-Verhältnis von 1:0.5 zurückzuführen [124].

Für die FMN-Bindung des *M. tuberculosis* Dodecins wurde ein K_D von $1 \mu\text{M}$ [147] bzw. 920 nM [169] ermittelt; eine weitaus schwächere FMN-Bindung kann für das *S. coelicolor* Dodecin mit einem K_D von $50 \mu\text{M}$ beobachtet werden. Auch die Flavinbindung an das eubakterielle Halobacterium *H. halophila* weist mit $2.5 \mu\text{M}$ (Lumichrom), $20.4 \mu\text{M}$ (Riboflavin), $6.4 \mu\text{M}$ (FMN) sowie $24.0 \mu\text{M}$ (FAD) deutlich geringere Bindungsaffinitäten auf [124].

4.4 Die CoA-Bindung in eubakteriellen Dodecinen

Durch Lösen der hochauflösenden Röntgenstrukturdaten der *T. thermophilus* R65A-Mutante konnte in der dreizähligen Symmetriestelle II Elektronendichte erhalten werden, die sich schließlich trimerisiertem CoA in der reduzierten Form zuordnen ließ (Abb. 68). Das im Dodecin endogen gebundene CoA konnte außerdem massenspektrometrisch sowie durch den Ellman Assay zum Nachweis freier Thiole bestätigt werden.

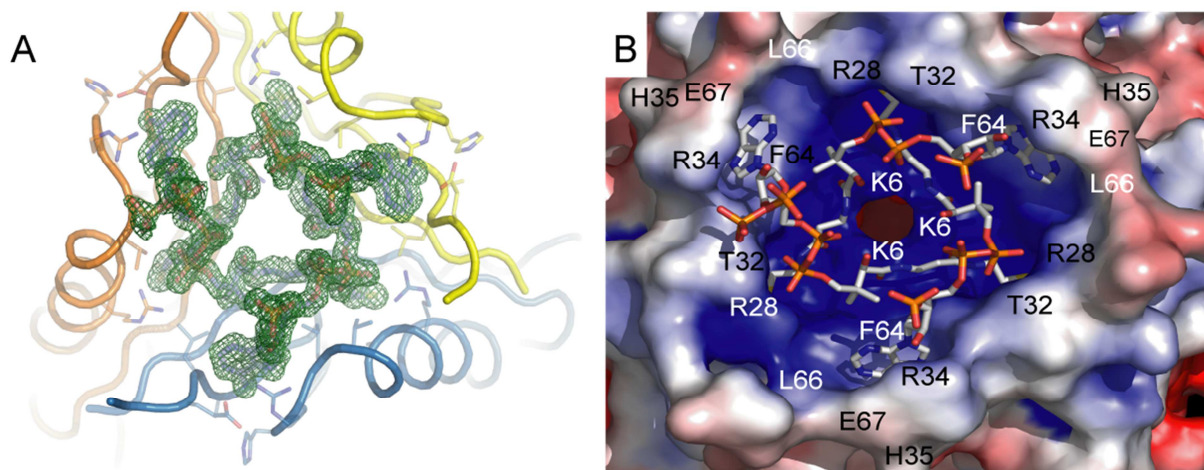


Abb. 68: Blick entlang der dreizähligen Achse II auf die CoA-Bindungsstelle der R65A-Mutante des *T. thermophilus* Dodecins

A: Die $2F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$ -Elektronendichte mit einem Konturierungslevel von 1.5σ ist in grün dargestellt. Für die 2'-Phosphatgruppe des CoA-Monomers 1 wurde zwei verschiedene Konformationen beobachtet.

B: Die elektrostatische Analyse wurde mit dem Programm APBS [144] durchgeführt. Hierbei wurde ein Probenradius von 1.4 \AA und eine Ionenstärke von 0.1 M verwendet.

Anhand des elektrostatischen Oberflächenpotentials (Abb. 68 B) lässt sich erkennen, dass die Coenzym A Bindungstasche des *T. thermophilus* Dodecins hauptsächlich durch positiv geladene (K6, R28, T32, R34, E67, R65 im WT-Dodecin) und hydrophobe (L10, A21, L33, F64, L66) Aminosäurereste gebildet wird. Insgesamt sind vier der zwölf positiv geladenen Aminosäuren jedes Monomers an der CoA-Bindung beteiligt, wobei die Bindung eines CoA-Moleküls durch alle drei Dodecin-Monomere der Bindungstasche erfolgt. Die größte Kontaktfläche mit 233 \AA^2 ist hierbei die Bindungstasche für die Adenineinheit; das mit 204 \AA^2 zweitgrößte Interface wird zwischen dem Pantetheinarm und dem benachbarten Monomer gebildet, während das dritte Dodecin-Monomer nur noch mit einer einzigen Wasserstoffbrückenbindung (85 \AA^2) an der CoA-Bindung beteiligt ist.

Unüblich für CoA-bindende Proteine ist das Nucleosid nicht in der 2'-*endo*-Konformation mit anti-glycosidischem Torsionswinkel gebunden, sondern nimmt eine Konformation ähnlich der für die Succinyl-CoA Synthetase [194] beobachteten ein. Die am Pyrophosphat geknickte Form des CoA-Kofaktors kommt hingegen in einer Reihe von Strukturen anderer CoA-bindender Proteine vor [55]. Neu ist dagegen die Trimerisierung des CoAs: Bislang wurden multimere CoA-Moleküle noch nicht in Proteinen beobachtet, wenn auch CoA-Moleküle häufig an den Kontaktflächen oligomerer Proteine gebunden sind [55].

Ein Sequenzalignment des *T. thermophilus* Dodecins mit den Orthologen aus *M. tuberculosis*, *S. coelicolor*, *P. aeruginosa* (siehe Abb. 69), *H. salinarum* und *H. halophila* zeigt, dass die Aminosäurereste, die im *T. thermophilus* Dodecin an der CoA-Bindung beteiligt sind,

innerhalb der Dodecine aus *T. thermophilus*, *M. tuberculosis* und *S. coelicolor* hoch konserviert sind. Dies führt zu der Vermutung, dass auch die Dodecine aus *M. tuberculosis* und *S. coelicolor* in der Lage sind, CoA in ähnlicher Weise zu binden wie das *T. thermophilus* Dodecin. Unterscheiden sich die putativen CoA-bindenden Aminosäuren zwischen den Dodecinen dieser Organismen, so sind sie meist nur durch eine homologe Aminosäure ersetzt. Beim *P. aeruginosa* Dodecin ist jedoch der wesentlich an der Bindung beteiligte Rest R28 zu der entgegengesetzt geladenen Aminosäure Glutamat ersetzt, so dass eine Verringerung der Affinität zu CoA zu erwarten ist.

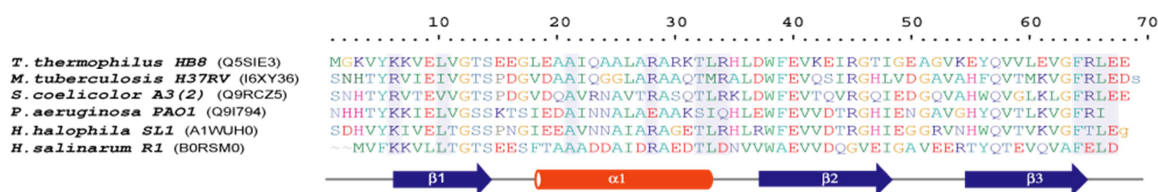


Abb. 69: Sequenzalignment der Dodecine aus *Thermus thermophilus* HB8, *Mycobacterium tuberculosis* H37RV, *Streptomyces coelicolor* A3(2), *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, *Halorhodospira halophila* SL1 und *Halobacterium salinarum* R1

Angegeben ist außerdem die Uniprot-Bezeichnung. Blau unterlegt sind die im *T. thermophilus* Dodecin an der CoA-Bindung beteiligten Aminosäuren.

Bindungsstudien, die von Bodo Sander während seiner Diplomarbeit durchgeführt wurden [147], zeigen eine deutliche Abnahme der Bindungsaffinität vom *T. thermophilus* Dodecin über das *M. tuberculosis* Dodecin zum *S. coelicolor* Dodecin. Interessanterweise war jedoch auch das *P. aeruginosa* Dodecin noch in der Lage, CoA zu binden, wies jedoch wie erwartet die geringste Affinität auf.

Durch Rekonstitution der Proteinlösung mit einer Coenzym A Lösung (*mt*-Dode_MC420) bzw. Kokristallisation mit CoA (*Sc* Dodecin) lassen sich Coenzym A-Trimere auch in den Kristallstrukturen der chemisch modifizierten *M. tuberculosis* Dodecin Mutante *mt*-Dode_MC420 [168] und des *S. coelicolor* Dodecins [147] nachweisen. Alle drei Kristallstrukturen des mit CoA-kokristallisierten *M. tuberculosis* WT Dodecins zeigen jedoch in der CoA-Bindungsstelle nur partielle CoA-Elektronendichte, so dass als Grundlage für die strukturelle Diskussion der CoA-Bindung im *M. tuberculosis* Dodecin die Struktur der *mt*-Dode_MC420-Mutante dient. Eine strukturelle Untersuchung des *P. aeruginosa* Dodecins wurde bislang noch nicht vorgenommen.

Durch die hohe Konservierung der an der CoA-Bindung beteiligten Aminosäuren unterscheiden sich die CoA-Bindungstaschen der Dodecine aus *T. thermophilus*, *M. tuberculosis* und *S. coelicolor* nicht wesentlich voneinander (siehe Abb. 70). Die Thiolgruppe, die in anderen Proteinen oft acyliert vorkommt, ist in einer hauptsächlich hydrophoben Bindungstasche verborgen, die im *T. thermophilus* Dodecin von den Resten L10, T32, A29 und R28 gebildet wird; dies entspricht im *M. tuberculosis* Dodecin den Aminosäuren I11, M33, A30 und R29 bzw. im *S. coelicolor* Dodecin den Resten V10, T33, A30 und R29. Auch die Adenineinheit des CoA ist durch hydrophobe und polare Interaktionen stabilisiert: Neben der Bindung durch den senkrecht orientierten Aminosäurerest F64 formen die Reste L33 und L66 (*Mt*: F65, M34, L67, *Sc*: F65, L34, L67) eine hydrophobe Bindungstasche. Außerdem bilden die Hauptkettenamidgruppen der Reste E67 und R34 Wasserstoffbrückenbindungen (E68 und R35 in *Mt* und *Sc*) zu den N1- bzw. N7-Atomen aus, und die Hauptkettencarbonylgruppen der Reste R34 und R65 bzw. A65 in der R65A-Mutante (R35 und R66 im *Mt* und *Sc* Dodecin) stabilisieren die Aminogruppe. Diese Bindung der Aminogruppe der Adenineinheit durch Hauptgruppenatome ist ein weit verbreiteter Bindungsmodus bei CoA-bindenden Proteinen [55].

Das Ribose-3'-Phosphat, der 5'-Phosphatester und die Pantetheineinheit sind wie in anderen CoA-bindenden Proteinen hauptsächlich durch Wasserstoffbrückenbindungen und Salzbrücken stabilisiert. Zum Beispiel bilden im *T. thermophilus* Dodecin die am Boden der Bindungstasche lokalisierten K6-Reste der benachbarten Monomere, die im *Mt* und *Sc* Dodecin durch die homologe Aminosäure R7 ersetzt sind, eine Wasserstoffbrücke zu den Carbonylgruppen des Pantetheins aus. Das Diphosphat formt H- bzw. Salzbrücken zu den Resten T32 und R28 (T33 und R29 in *Mt* und *Sc*) und die Ribose-2'-Hydroxygruppe bildet eine Wasserstoffbrücke zu R34 (R35 in *Mt* und *Sc*). Bedingt durch die Form der Bindungstasche treten außerdem intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Phosphatester-Sauerstoffatomen (PO10-AO2, zur Bezeichnung der Atome siehe Anhang 3), der Carbonylgruppe des Pantetheins mit dem Phosphatester (AO6-AO2) sowie zwischen der 2'-Hydroxylgruppe der Ribose mit der 3'-Phosphatgruppe der Ribose (AO8) auf, die zu der V-förmigen Anordnung der CoA-Monomere führen. Jedoch ist das CoA-Molekül nicht so sehr verborgen, dass es zu einer Wechselwirkung zwischen der Pyrophosphatgruppe und der Adenineinheit kommen kann, wie es etwa in der Enoyl-Citrat-Hydratase, der Citrat-Synthase und dem CoA-Bindungsprotein der Fall ist [55].

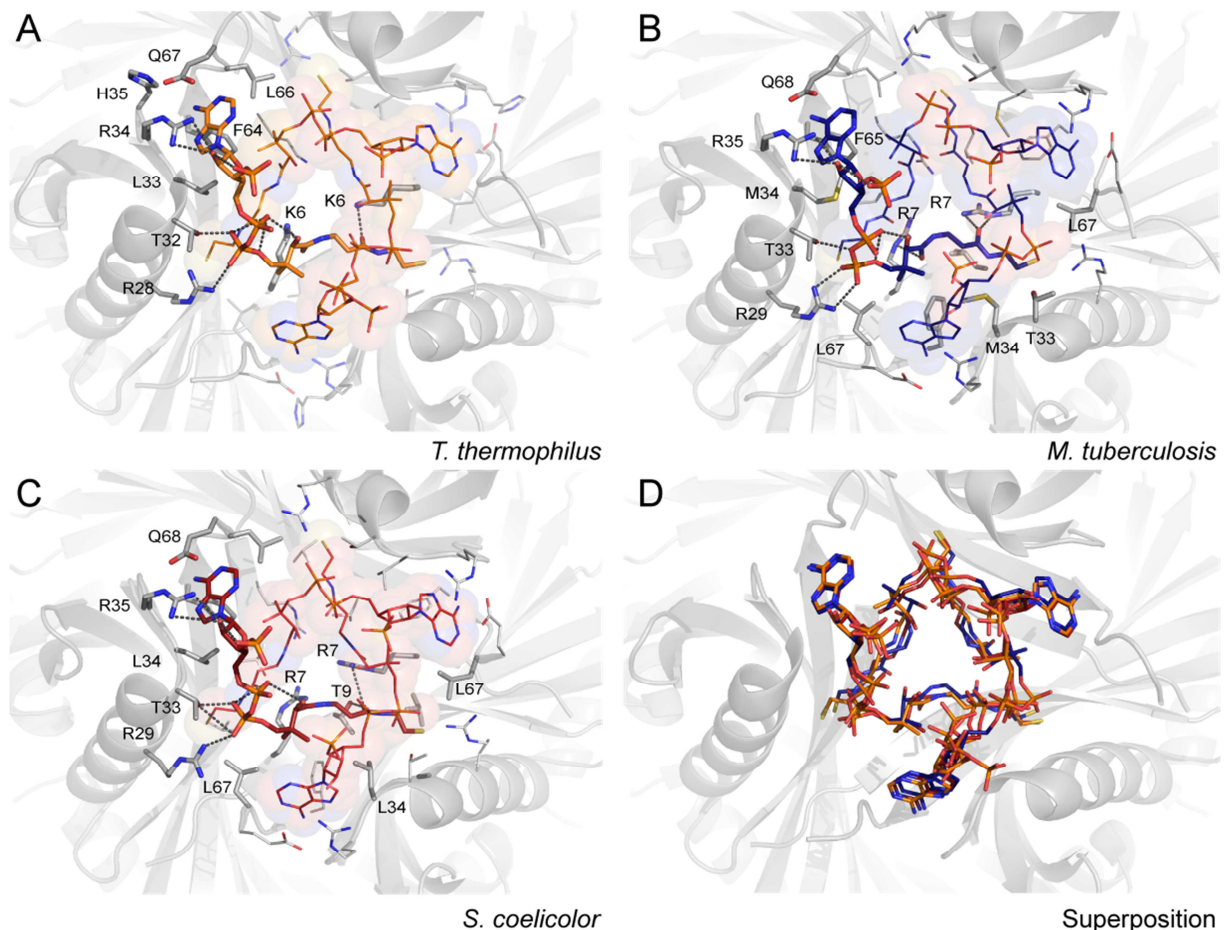


Abb. 70: Bindung des Coenzym A in der Bindungstasche

Dargestellt ist hier die CoA-Bindung im *T. thermophilus* Dodecin (A), dem *M. tuberculosis* Dodecin (B, 2yj0) und dem *S. coelicolor* Dodecin (C [147]). Für eine bessere Sicht ist jeweils das CoA-Monomer aus Kette A sowie Aminosäurereste im Abstand von 4 Å um dieses CoA-Molekül hervorgehoben. Die Nummerierung der Aminosäuren erfolgte anhand des Uniprot-Eintrags. Die beiden anderen CoA-Monomere sind außerdem als Kugelmodell gezeigt. Polare Interaktionen sind als schwarz gepunktete Linien eingezeichnet. In der Superposition sind die CoA-Trimere der Dodecine aus *T. thermophilus* (orange), *M. tuberculosis* (blau) und *S. coelicolor* (rot) überlagert. Die Aminosäurekette entspricht der des *T. thermophilus* Dodecins.

Neben der Stabilisierung durch die Proteinumgebung finden außerdem stabilisierende Wechselwirkungen zwischen den CoA-Monomeren untereinander durch die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem Phosphat-Ester und der Hydroxylgruppe des Pantetheins statt (PO10-AO5).

Im Gegensatz zu der Adenineinheit, dem Phosphopanthethein und der Thiolgruppe, die alle durch eine Reihe von Wechselwirkungen zu den umliegenden Aminosäuren stabilisiert sind, ragt die 3'-Phosphatgruppe der Ribose aus der Bindungstasche heraus, so dass hier keine Interaktion mit der Proteinumgebung stattfinden kann – ein Phänomen, das auch bei anderen CoA-bindenden Proteinen beobachtet werden kann [55].

Bislang konnte die Bindung von CoA in den halophilen Dodecinen nicht nachgewiesen werden. Auf Grundlage der Proteinsequenz kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass auch sie in der Lage sind, CoA zu binden. Aufgrund ihrer nahen Verwandtschaft zum *T. thermophilus* Dodecin weist die *H. halophila* Dodecinsequenz interessanterweise wesentliche Reste der CoA-Bindungstasche auf (K7, R29, T33, L34, R35, F65, L67, E68). Beim *H. salinarum* Dodecin ist jedoch der Rest R34, der in den anderen Dodecinen mit der Bildung von drei Wasserstoffbrückenbindungen einen wesentlichen Beitrag zur Bindung leistet, durch den negativ geladenen Rest D34 ersetzt, vermutlich aufgrund der Eigenart halophiler Organismen durch negativ geladene Oberflächen die Löslichkeit in hypersaliner Umgebung zu erhöhen und auf diese Weise Aggreagation zu vermeiden.

4.5 Die biologische Funktion

Eine biologische Funktion für eubakterielle Dodecine ist zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht endgültig geklärt; die Suche nach einer möglichen biologischen Funktion wird dadurch erschwert, dass Dodecine nicht in Genclustern auftreten und nur in etwa 3 % der bislang sequenzierten bakteriellen Genome auftreten. Außerdem sind Dodecine zum Überleben des Organismus unter Normalbedingungen nicht essentiell, wie die Untersuchungen an Dodecin-Knockout-Mutanten zeigen (diese Arbeit sowie Oesterhelt, persönliche Mitteilung). Des Weiteren ist es nicht auszuschließen, dass Dodecine in eubakteriellen und archaebakteriellen Organismen unterschiedliche Funktionen besitzen.

Für Flavin-bindende Proteine gibt es eine begrenzte Auswahl an möglichen biologischen Funktionen. Zum einen kann der gebundene Flavinkofaktor an biologischen Redoxprozessen beteiligt sein oder als Elektronentransmitter in Elektronenübertragungsprozessen fungieren. Neben der Rolle als Redoxpartner könnten Flavine jedoch auch an Photoreaktionen teilnehmen bzw. als Flavinspeicherprotein oder -Transporter dienen.

Eine mögliche Funktion der eubakteriellen Dodecine als Redoxprotein scheint aufgrund der schweren Reduzierbarkeit des Dodecin-gebundenen Flavins mit üblichen Redoxmitteln wegen des ungewöhnlich niedrigen Redoxpotentials auszuschließen. Eine Reduktion der tief in der Flavinbindungstasche liegenden N3-H-Gruppe würde außerdem zum Bruch der Bindung zwischen Aminosäurerest G57 und N3-H des Flavins und damit vermutlich zu einer Freisetzung des Flavins kommen, wie es bei dem leichter zu reduzierenden archaebakteriellen Dodecin aus *H. salinarum* gezeigt werden konnte [171].

Eine Funktion als Lichtsammler in Analogie zu den Antennen-bindenden Domänen der Photolyase oder der LHC-Komponenten des photosynthetischen Apparates scheidet aufgrund der Tatsache aus, dass beim Dodecin kein Triplettzustand beobachtet wird – eine Voraussetzung, die das Dodecin als Lichtsammler erfüllen müsste – entweder weil kein *intersystem crossing* zum Triplettzustand stattfindet oder dieser so kurz ist, dass er außerhalb des messbaren Bereichs liegt.

Hingegen wahrscheinlich ist eine Rolle des Dodecins als Speicherprotein für Flavine. Als kleinstes Flavoprotein überhaupt, ist es in der Lage, als Dodecamer auf engstem Raum zwölf Flavinmoleküle so zu binden, dass sie sowohl photochemisch als auch redox-inaktiv sind. Die Bindung der Flavine als Dimere scheint ausschließlich der besseren Platznutzung zu dienen, da EPR-Untersuchungen und Rechnungen auf der Grundlage zeitaufgelöster Spektroskopie zu dem Ergebnis kommen, dass zwischen den Dimeren keinerlei elektronische Interaktion stattfindet.

Die beobachtete verzögerte Aufnahme der Flavine erlaubt geringe Mengen an freiem Flavin unter *non-stress*-Bedingungen, bevor es bei Erreichen einer kritischen Konzentration zu einem effizienten Flavinspeicherprotein wird. Dies könnte etwa dann notwendig werden, wenn durch eine Denaturierung z.B. durch Hitzeschock plötzlich hohe Konzentrationen an freiem Flavin freigesetzt werden, das eine phototoxische Wirkung auf die Zelle durch DNA-Schädigung, den Abbau aromatischer Aminosäuren oder die oxidative Degradation von Lipiden [195] [156] besitzt. Durch die effektive Bindung wären diese nicht mehr frei in Lösung verfügbar, ständen jedoch trotzdem noch bei erhöhtem Flavinbedarf zur Verfügung. Auch lichtinduzierte phototoxische Abbauprodukte des Riboflavins wie Lumichrom werden mit hoher Affinität gebunden und können somit ihre schädigende Wirkung nicht entfalten. Für diese Hypothese spricht die erhöhte Affinität gegenüber dem an Stoffwechselwegen kaum beteiligten Riboflavin sowie seiner phototoxischen Abbauprodukte Lumiflavin und Lumichrom im Gegensatz zu den geringeren Affinitäten für FMN und FAD.

Für das *H. salinarum* Dodecin wurde neben einer Rolle als Speicherprotein für phototoxische Riboflavin-Degradationsprodukte eine Beteiligung an der Biosynthese von Flavoproteinen nachgewiesen: Unter wachstumslimitierenden Bedingungen speichert das *H. salinarum* Dodecin Riboflavin in mikromolaren Konzentrationen, um es dann bei hoher metabolischer Aktivität für die Biosynthese von FMN und FAD freizusetzen [96].

Ob diese Funktion auch für das Dodecin aus *T. thermophilus* oder anderer eubakterieller Dodecine zutrifft, ist noch zu untersuchen. Dagegen spricht jedoch, dass für die Dodecine aus

T. thermophilus, *M. tuberculosis* und *P. aeruginosa* FMN als endogen gebundener Kofaktor nachgewiesen wurde.

4.6 Anwendungen

Dodecine besitzen *per se* eine Reihe von Eigenschaften, die sie zu einem wertvollen Instrument für unterschiedliche Anwendungen machen. Im Folgenden soll auf die Anwendung der Dodecine als potentieller Fusionspartner bei der Kristallisation von Proteinen und auf ihre Rolle als Biokatalysatoren eingegangen werden. Des Weiteren wurden Dodecine als Blaulicht- gesteuerte molekulare Käfige sowie als molekulare Schalter eingesetzt.

4.6.1 Dodecine als *Crystallization tags*

Im Rahmen diverser Strukturgenomik-Projekte wurden in den letzten Jahren verschiedene Verfahren entwickelt, um die Eigenschaften von Proteinen – im Besonderen von Membranproteinen – im Hinblick auf ihre Kristallisierbarkeit zu verbessern. Eine Methode besteht darin, das Membranprotein bzw. allgemein das Zielprotein mit einem geeigneten Tag zu fusionieren und somit Löslichkeit, Aufreinigung oder die Kristallisierbarkeit zu erhöhen. So sind viele Beispiele bekannt, in denen kleinere Proteine wie z.B. das Maltose-binding-Protein (MBP, 43 kDa), das TrxA, ein 12 kDa-Protein aus *E. coli*, SUMO (small ubiquitin related modifier, 11 kDa) oder die Glutathion Transferase (GST, 26 kDa) durch intrinsische Chaperonaktivität (MBP), Spaltung von Disulfidbrücken (TrxA) oder durch Bildung eines Nukleationskerns (SUMO) für die korrekte Faltung ihres meist cytosolischen Fusionspartners und für bessere Kristallisierbarkeit sorgen [196-198]. Durch die Fusion des Tag-Proteins mit einem Membranprotein soll der hydrophile Charakter des Gesamtproteins erhöht werden, wovon man sich eine Verringerung der Aggregation und eine Verbesserung der Kristallisationseigenschaften durch stabilere Kristallkontakte erhofft. Ein prominentes Beispiel sind die Anwendungen von Kobilka *et al*: Durch Fusion von T4-Lysozym-Varianten als N-terminale Fusion [199] oder Insertion [200] mit G-Protein-gekoppelten Rezeptoren gelang die Strukturaufklärung verschiedener GPCRs, was Kobilka den Nobelpreis für Chemie 2012 einbrachte.

Aufgrund seiner intrinsischen Eigenschaften scheint auch das Dodecin als *solubility enhancing tag* (SET) prädestiniert zu sein: Neben hohen Expressionraten und einer hohen cytosolischen Löslichkeit besitzt es eine außerordentliche Thermostabilität, die sich eventuell auch auf das Fusionsprotein übertragen ließe. Außerdem bildet es einen stabilen dodecameren

Komplex, dessen N- und C-Termini auf der äußeren Oberfläche liegen, so dass sowohl N- auch C-terminale Fusionen möglich sind. Gelingt nun die strukturell geordnete Anordnung des Zielproteins auf der Oberfläche des dodecameren Komplexes, könnte dies neben einer Verbesserung der Löslichkeit auch zu einem verbesserten Kristallwachstum führen.

Eine Strategie, die bei der Konstruktion hochsymmetrischer Fusionsproteine angewendet wurde, zeigt Abb. 71 [201]:

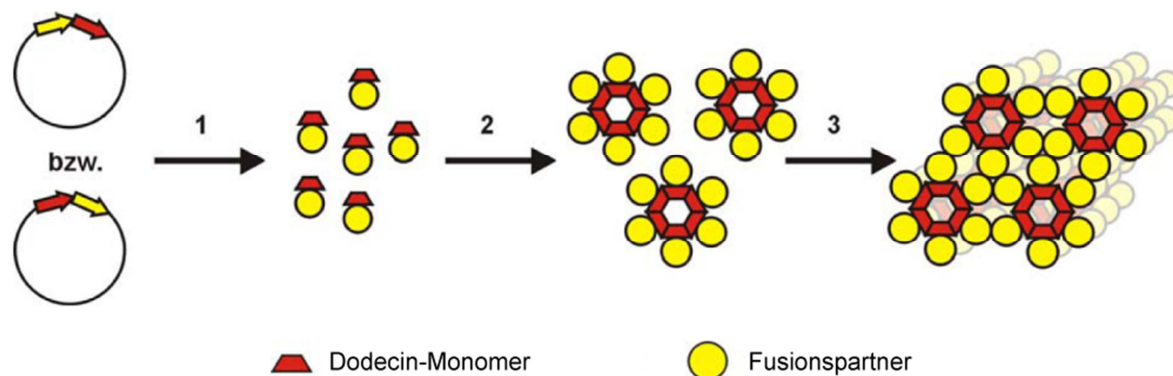


Abb. 71: Schema zur Konstruktion hochsymmetrischer Fusionsproteine auf Grundlage des Dodecins [201]

- 1: Produktion des Zielproteins als N- bzw. C-terminale Fusion mit Dodecin
- 2: Assemblierung des Fusionsproteins als Dodecamer
3. Kristallisation

Nach der Konstruktion einer N- oder C-terminalen Fusion sollte das Fusionsprotein korrekt gefaltet und in löslicher Form exprimiert werden und sich als Dodecamer assemblieren. Nach der Aufreinigung des Fusionsproteins würde die Ausbildung eines geordneten Kristallgitters durch die hohe Symmetrie des Dodecamers begünstigt werden.

Von entscheidender Bedeutung ist hierbei der Linkerbereich zwischen Tag- und Zielprotein. Zum einen muss der Linker rigide sein [202] und muss eine Länge haben, die eine sterische Abstoßung der beiden Fusionspartner vermeidet. Gleichzeitig muss aber auch verhindert werden, dass die beiden Hälften der Proteinfusion zueinander zu flexibel sind, da eine zu hohe Flexibilität zu einem gleichzeitigen Vorliegen mehrerer Konformationen und somit zu einer Erschwerung der Kristallisation führen würde [197].

Erste Versuche von N- und C-terminalen Dodecin-Zielprotein-Fusion zeigten, dass die flexiblen Termini des Dodecins allein als Linkerbereich nicht ausreichen [201]. Mit dem 11 Å langen α -helikalen Linker A₃SA₃ konnte ein stabiles Fusionprotein mit dem C-terminal gebundenen Porin aus *R. blasticus* (BI-Porin) gewonnen werden [203]. Ein Modell dieser

Fusion zeigt Abb. 72. Hierbei wurde die Fusion in Form von unlöslichen *inclusion bodies* exprimiert und das Membranprotein auf der Oberfläche des dodecameren Komplexes zurückgefaltet.

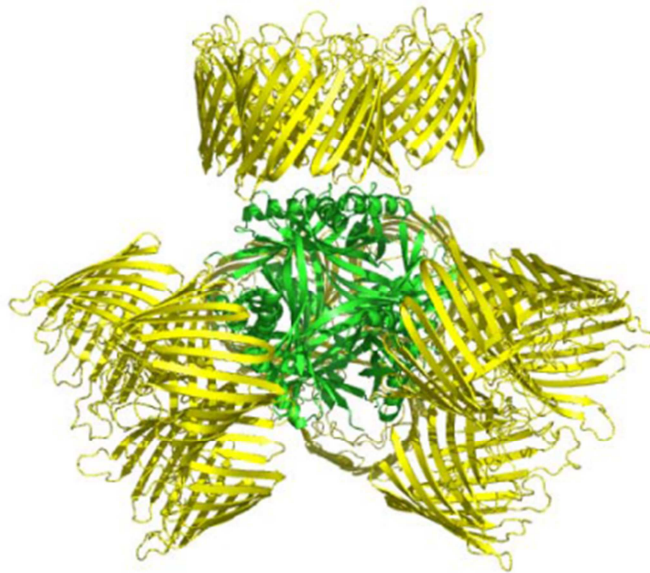


Abb. 72: Modell der BI-Porin-Dodecin-Fusion (Blick entlang der dreizähligen Achse) [203]
Der Dodecin-Dodecamer ist in grün dargestellt, die BI-Porin-Moleküle in gelb.

Die biophysikalische Charakterisierung bestätigte schließlich die korrekte Faltung des Fusionsproteins und zeigte, dass auch die thermische Stabilität des Dodecins auf die Fusion übertragen werden konnte. Jedoch erfolgte unter den getesteten Bedingungen keine Kristallisation des Fusionsproteins [203], so dass es hierbei einer weiteren Optimierung des Linkerbereichs bedarf.

Sollte sich diese Methode nach Optimierung des Linkers jedoch auch auf andere Dodecin-Membranprotein-Fusionen übertragen lassen, könnte sie sicherlich wichtige Beiträge zur Strukturaufklärung von Membranproteinen liefern.

4.6.2 Dodecin-Biohybride als schaltbare Katalysatoren

Das Entwickeln stabiler, hochgeordneter Käfigstrukturen mit definierten Hohlräumen ist ein wesentlicher Aspekt der Nanotechnologie. Anwendung finden sie beispielsweise bei der Speicherung kleinerer Moleküle oder Pharmazeutika oder der Verwendung als molekularer Siebe. Kompaktere Strukturen spielen z.B. beim Präsentieren von Antigenen auf der Oberfläche eine Rolle. Als Grundlage für hochgeordnete Strukturen mit wohldefinierten

Hohlräumen dienen hierbei entweder natürliche Materialien wie Nukleinsäuren oder Proteine sowie strukturell veränderte Versionen derselben.

Oligomere Proteinkomplexe weisen üblicherweise große, innere Hohlräume auf, deren Zugänglichkeit gut kontrolliert ist. Auf diese Weise erlauben Ferritine die Speicherung von kleinen Molekülen [204] oder Proteasomen die Katalyse an hochreaktiven nicht-spezifischen Aktivitätszentren [205].

Ein interessanter Aspekt ist es deshalb, Cavitäten von oligomeren Proteinen chemisch so zu modifizieren, dass synthetische Komponenten wie Katalysatoren oder Reaktionsprodukte an das Protein geknüpft werden können. Durch diese Funktionalisierung sollte es möglich sein, völlige Kontrolle über den Substrat/Produkt Eingang bzw. Ausgang zu erhalten oder die Speicherung neuer, nicht-natürlicher Substanzen zu erlauben.

Als strukturelle Template für die Konstruktion solcher Biohybrid-Proteine benötigt man hochstabile Komplexe mit großen inneren Hohlräumen; dies sind Bedingungen, die das Dodecin *per se* erfüllt. So besitzt die innere Cavität einen Durchmesser von 26 Å und ein Volumen von etwa 9600 Å³, so dass die Einlagerung von Komponenten bis zu einer Größe von 327 Da/Monomer möglich ist, nimmt man einen Solvensgehalt von 50 % an.

Versuche, die von Xenia Vinzenz zur Funktionalisierung des Dodecins durchgeführt wurden, beinhalteten die S-Alkylierung von Cystein-Resten, die im inneren Hohlraum durch ortsspezifische Mutagenese eingeführt wurden, mit einer synthetischen Dansyl-Komponente (N-(2-Ethyl-iodo-acetamid)-dansyl) als Modellsystem für ein Dodecin-Katalysator-Hybrid (Abb. 73). Die Kopplungsreaktion zur Funktionalisierung funktionierte sowohl mit dem gefalteten Dodecin als auch im entfalteten Zustand, so dass die Zugänglichkeit einer Komponente mit der Größe des Dansyls gegeben zu sein scheint. Auch die Schaltbarkeit des Katalysators durch Regulation der Zufahrtswege scheint gegeben.

Die erhaltene Kristallstruktur des Dansyl-Dodecins zeigte, dass die Dansyl-Komponente den inneren Hohlraum fast vollständig ausfüllt, eine Funktionalisierung mit einem wesentlich größeren Baustein bei der Funktionalisierung aller 12 Monomere wäre demnach nicht möglich. Diese Innenraum-Limitierung könnte man durch Verknüpfung einzelner Dodecamermonomere auf molekularbiologischer Ebene umgehen, um so eine Kugel desselben Volumens mit dergleichen Gesamtstruktur aber aus weniger Monomeren und weniger Modifikationsstellen zu erhalten [148].

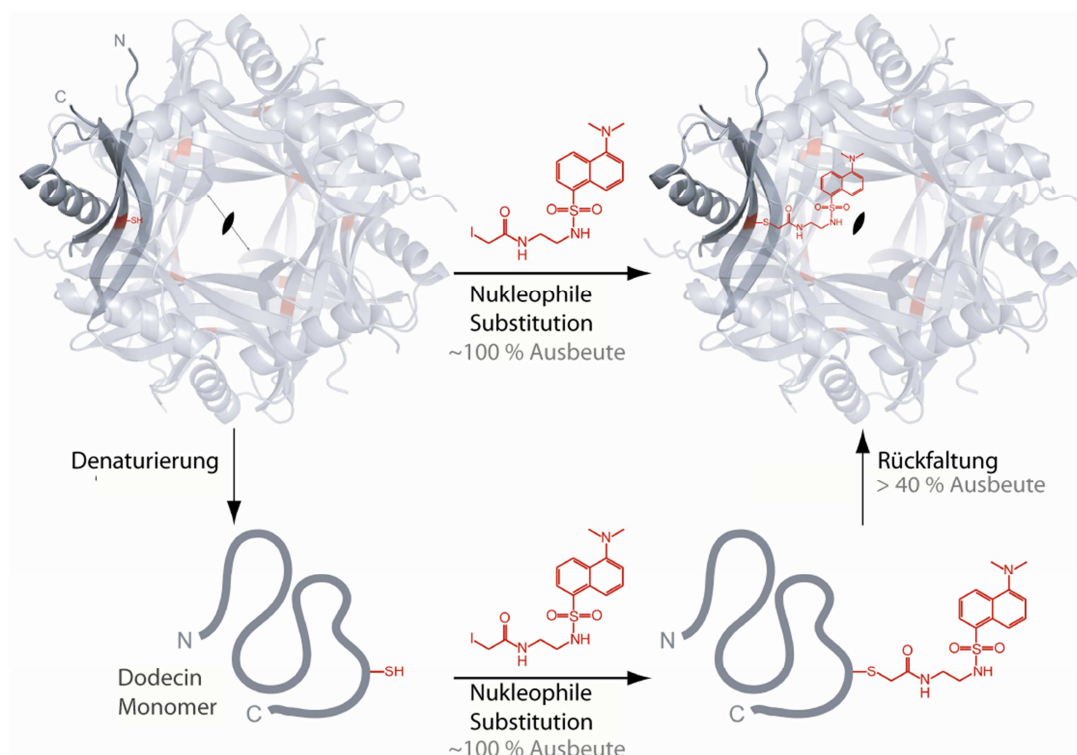


Abb. 73: Die Erzeugung von Dodecin-Dansyl-Hybriden durch S-Alkylierung [168]

Oberer Weg: Funktionalisierung des gefalteten Dodecins

Unterer Weg: Funktionalisierung des entfalteten Dodecins mit anschließender Rückfaltung

Der synthetische Dansyl-Baustein sowie durch ortsspezifische Mutagenese eingeführte Cysteinreste im Inneren des Komplexes sind in rot dargestellt.

Ein anderer Ansatz, den inneren Hohlraum zu vergrößern, könnte auch durch Fusion mit einem andern selbst-assemblierenden oligomeren Protein erreicht werden. So konnten Yeates *et al.* durch die Fusion eines natürlich vorkommenden dimeren mit einem trimeren Protein nach *self-assembly* eine geordnete hetero-dodecamere Käfigstruktur erschaffen [206], die sich je nach Linkerlänge auch zu einem aus 24 oder 60 Untereinheiten bestehenden Komplex erweitern lässt [207]. Eine Variation der Hohlräumgröße lässt sich außerdem durch die Kombination anderer Proteine erreichen. Andere Ansätze zur Erzeugung von Käfigstrukturen auf der Grundlage selbst-assemblierender Untereinheiten beschäftigen sich mit dem *de novo* Design auf der Basis einfacher Sekundärstrukturelemente wie etwa *coiled-coiled*-Strukturen [208] [209].

4.6.3 Dodecine als Blaulicht-gesteuerte molekulare Käfige

Molekulare Käfige besitzen interessante Anwendungen in der Abgabe und Dosierung von Arzneimitteln [210], bei Transport und Aktivierung chemischer und biologischer Reaktanden

sowie bei der Initiierung biologischer Prozesse zu bestimmter Zeit bzw. an definiertem Ort [211]. Viele solcher Moleküle, die als molekulare Käfige oder photochemisch spaltbare Schutzgruppen verwendet werden, werden von UV-Licht kontrolliert [210-212], doch auch Blaulicht-induzierte Reaktionen sind bekannt, was durch die relativ schonende Aktivierung besonders für biologische Reaktionen günstig ist [213].

Der Ansatz, der von Nöll *et al.* verfolgt wurde [193], basiert auf der Eigenschaft des halophilen Dodecins, gebundene Flavine bei Reduktion freizusetzen; diese Reaktion ist zudem reversibel und führt nicht zur Degradation des apo-Dodecins [171]. Bei der Anwendung des Dodecins als molekularer Käfig werden artifizielle Flavine mittels eines $-(CH_2)_6-NH_2$ -Ankers an beliebige Moleküle (im Folgenden auch als *drug* bezeichnet) gebunden. Durch Bildung des Dodecin-Flavin-Holokomplexes kommt es dann zu einer Inaktivierung des Moleküls. Auf diese Weise kann das Dodecin mit bis zu 12 Flavin-*drug*-Derivaten beladen und zu jedem beliebigen Ort transportiert werden. Durch Reduktion des Flavins – hier durch photochemische Reduktion mit Blaulicht in der Anwesenheit von EDTA – wird die Dissoziation des Holokomplexes in apo-Protein und Flavin-*drug*-Derivat ausgelöst und das Molekül wird wieder aktiviert, siehe Abb. 74.

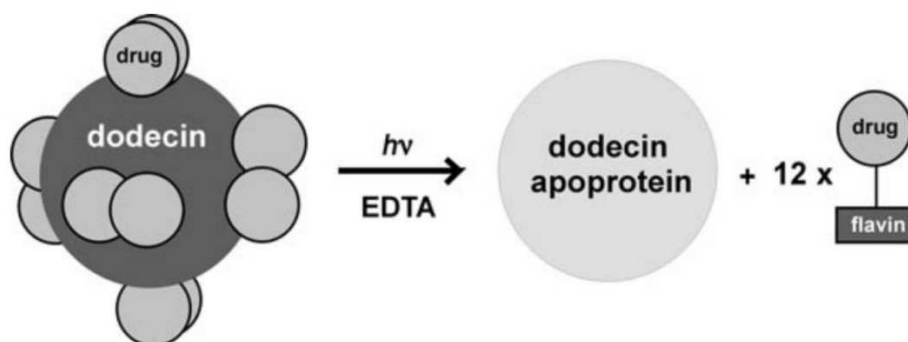


Abb. 74: Auf Dodecinen basierendes Blaulicht-induziertes Freisetzungssystem [193]

Mit Modellsystemen wie einem Flavin-DNA Liganden sowie einem Flavin-Boron Dipyrrromethen (BDP)-Liganden, die Dissoziationskonstanten von 690 bzw. 470 nM aufwiesen, konnten Nöll *et al.* zeigen, dass bei einer Bestrahlung bei 460 nm für mehrere Minuten eine Freisetzung des Flavin-*drug*-Derivates stattfand. Allerdings war die Freisetzungsrage aufgrund des Quencheffektes des zum Flavin benachbarten Tryptophan-Restes zu gering, um eine Quantenausbeute zu berechnen.

4.6.4 Dodecine als molekulare Schalter

Auch die Anwendung der Dodecine als molekulare Schalter beruht auf der Eigenschaft des halophilen Dodecins, Flavine bei Reduktion in einer reversiblen, nicht-degenerativen Reaktion freizusetzen. Hier werden die als redox-aktiven Andockstellen verwendeten Flavinliganden mittels eines molekularen Kabels auf einer Goldoberfläche adsorbiert und nach der Inkubation mit apo-Dodecin stabile Protein-Ligand-Komplexe erhalten. Durch Anlegen einer Spannung von -600 mV an der Goldoberfläche soll durch den Elektronentransfer durch die DNA das Flavin reduziert und das apo-Dodecin wieder freigesetzt werden [171], siehe Abb. 75. Die Funktion eines Schalters – das mehrmalige An- und Abschalten – sollte aufgrund der Reversibilität der Flavin-Bindungs-Reaktion möglich sein.

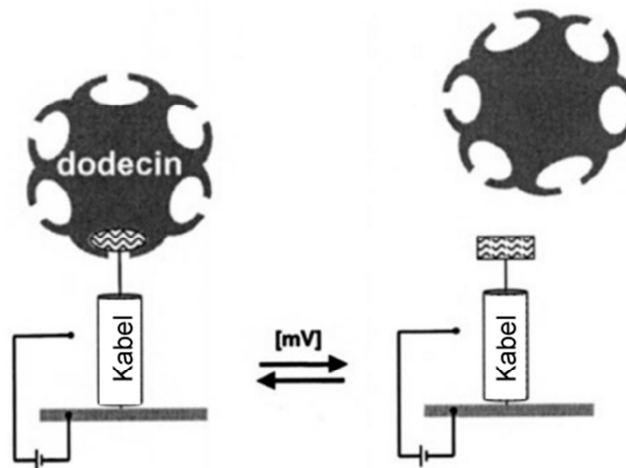


Abb. 75: Dodecine als molekulare Schalter [171]

Derivate aus Flavinen und molekularem Kabel werden über einen Linker an einer Elektrodenoberfläche adsorbiert. Durch Reduktion ändert sich die sterische und elektronische Konstitution des Isoalloxazinrings, was zur Beeinträchtigung der Stabilität des Protein-Ligand-Komplexes führt. Dies erlaubt einem die elektrochemische Steuerung des geladenen bzw. ungeladenen Zustandes.

Die Abbildung wurde aus [171] entnommen.

Erste Versuche mit doppelsträngiger DNA als Linker, einem Mercaptohexylrest zur Befestigung der DNA an der Goldoberfläche und einer Ethylgruppe als Linkerbereich zwischen Flavin und DNA führten zwar zur Freisetzung des Flavins, jedoch zeigte sich eine Limitierung der Stabilität der aufgetragenen Schicht aufgrund der Anwesenheit von Defekten durch eine Fehlorientierung der Flavin-DNA-Schicht. Eine Änderung der Adsorptionsart zur Vermeidung von Defekten resultierte hingegen in einer elektrochemisch inaktiven Oberfläche. Als wichtige den Elektronentransport beeinflussende Faktoren nennen die

Autoren zum einen die Art der Verankerung der DNA als auch die Länge der Alkylkette, die die DNA mit dem Flavin verbindet. In einem weiteren Ansatz wurden deswegen sowohl der Sulfid-Linker, als auch die Länge der Alkylkette und die Länge der verwendeten DNA verändert [172]. Doch auch durch die Verwendung von drei 1,2 Dithian-Resten, die sechs Verankerungen mit der Goldoberfläche ausbilden und die DNA fester binden, einem Flavin-DNA-Ligand mit nur fünf Basenpaaren und einer Propyl-Gruppe als Verbindung zwischen Flavin und DNA, konnte kein Elektronentransport erreicht werden. Da die chemische Reduktion des Flavins mit Natriumdithionit unter allen getesteten Bedingungen möglich ist, sehen die Autoren das Problem in der Wahl der verwendeten DNA, so dass weitere Versuche in der Verwendung DNA anderer Basensequenz oder Reduzierung der Basen resultieren bzw. alternativ in der Verwendung anderer Materialien wie Kohlenstoffnanoröhren oder organische π -Systeme.

4.7 Abschließende Bemerkung

Ein wichtiger Aspekt dieser Arbeit ist der unterschiedliche Flavin-Bindungsmodus zwischen eubakteriellen und archaebakteriellen Dodecinen, der auch mit Unterschieden in der Funktion einherzugehen scheint. Gezeigt werden konnte in dieser Arbeit, dass auf jeden Fall eine Speicherung der Flavine stattfindet, bei der die Eigenschaften freier Flavine vollkommen deaktiviert werden, ähnlich wie es bei den Riboflavin-bindenden Proteinen RfBPs der Fall ist. Leider konnte kein Phänotyp für die *P. aeruginosa* Dodecin Mangelmutatente gefunden wurde, der Aufschluss darüber geben könnte, unter welchen Bedingungen diese Art von Speicherung erfolgt. Zur genauen Bestimmung der Funktion ist daher die Findung eines Phänotyps essentiell. Dieser könnte auch die noch ausstehende Frage klären, warum die eubakteriellen Dodecine bevorzugt FMN, nicht jedoch Riboflavin oder Lumiflavin, die ja als eigentliche Sensitizer fungieren und daher besonders gefährlich für die Organismen sind, binden. Wahrscheinlich ist jedoch, dass es sich bei Dodecinen um einen Schutzmechanismus zur Inaktivierung freier Flavine handelt, der sich in Bakterien zum Schutz vor der photosensitivierenden Wirkung freier Flavine entwickelt hat, vermutlich analog zur Entwicklung der Carotinoide, Polyphenole oder Tocopherole in Pflanzen. Da Flavin-bindende Dodecine in einer Reihe von Eubakterien, jedoch nur in wenigen halophilen Archaeobakterien vorkommen, fand vermutlich irgendwann ein horizontaler Gentransfer von den Bakterien auf die halophilen Organismen statt [94], der sich für die ständig dem Licht ausgesetzten Archaeobakterien als günstig erwies.

Unklar ist bislang noch die Funktion der CoA-Bindung. Warum scheint diese nur in den eubakteriellen Dodecinen vorzukommen? Unter welchen Bedingungen wird das CoA gebunden und wieder freigesetzt und welche Reaktionen gibt es, die gleichzeitig die Aufnahme bzw. Abgabe beider Kofaktoren erfordern? Die Klärung solcher Fragen erfordern weitere biophysikalische Studien der Organismen hinsichtlich der Homöostase ihrer CoA-Level.

Unabhängig von der biologischen Funktion bietet das Dodecin aufgrund seiner biochemischen Eigenschaften ein wertvolles Werkzeug für eine Reihe von biotechnologischen Anwendungen, die sicherlich in den nächsten Jahren weiter entwickelt und verfeinert werden.

5 Anhang

5.1 Abkürzungen

Å	Angström
AMP	Ampicillin
ATP	Adenosintriphosphat
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
Äq	Äquivalente
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
CoA	Coenzym A
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTNB	5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoat)
dNTP	desoxy-Neukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
E	Extinktion
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ENDOR	engl: <i>Electron Nuclear Double Resonance</i>
EPR	engl: <i>Electron Paramagnetic Resonance</i>
ESI	engl: <i>electrospray-ionization</i>
FMN	Flavinmononucleotid
FAD	Flavinadenindinukleotid
FPLC	engl: <i>fast performance liquid chromatography</i>
g	Gramm oder Erdbeschleunigung
Gm	Gentamycin
GTP	Guanosintriphosphat
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
<i>Hh</i>	<i>Halorhodospira halophila</i>
<i>Hs</i>	<i>Halobacterium salinarum</i>
HEPES	(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure)

HPLC	engl: <i>high performance liquid chromatography</i>
ITC	Isothermale Titrationskalorimetrie
ISC	engl: <i>Intersystem Crossing</i>
Kan	Kanamycin
K _D	Dissoziationskonstante
kb	Kilobasenpaare
(k)Da	(Kilo) Dalton
λ	Wellenlänge
LC	Lumichrom
LF	Lumiflavin
μ	mikro
M	molar
MALDI	engl: <i>matrix-assisted laser-desorption ionization</i>
MES	2-(N-morpholino)ethansulfonsäure
MPD	2-Methyl-2,4-pentandiol
<i>Mt</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
NAD(P)H	Nicotinamidadenindinukleotid(phosphat)
NC	Nextal Classic Suite Kristallisationsscreen
NCL	Nectal Classic Lite Suite Kristallisationsscreen
NA	Nextal Anions Suite Kristallisationsscreen
OAc	Acetat
OD _x	Optische Dichte bei der Wellenlänge x nm
<i>p.a.</i>	per analysis
<i>Pa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
pI	isoelektrischer Punkt
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RfBP	Riboflavin-bindendes Protein
r.m.s.d.	Standardabweichung (engl: <i>root mean square deviation</i>)
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SB	Sigma Basic Kristallisationsscreen

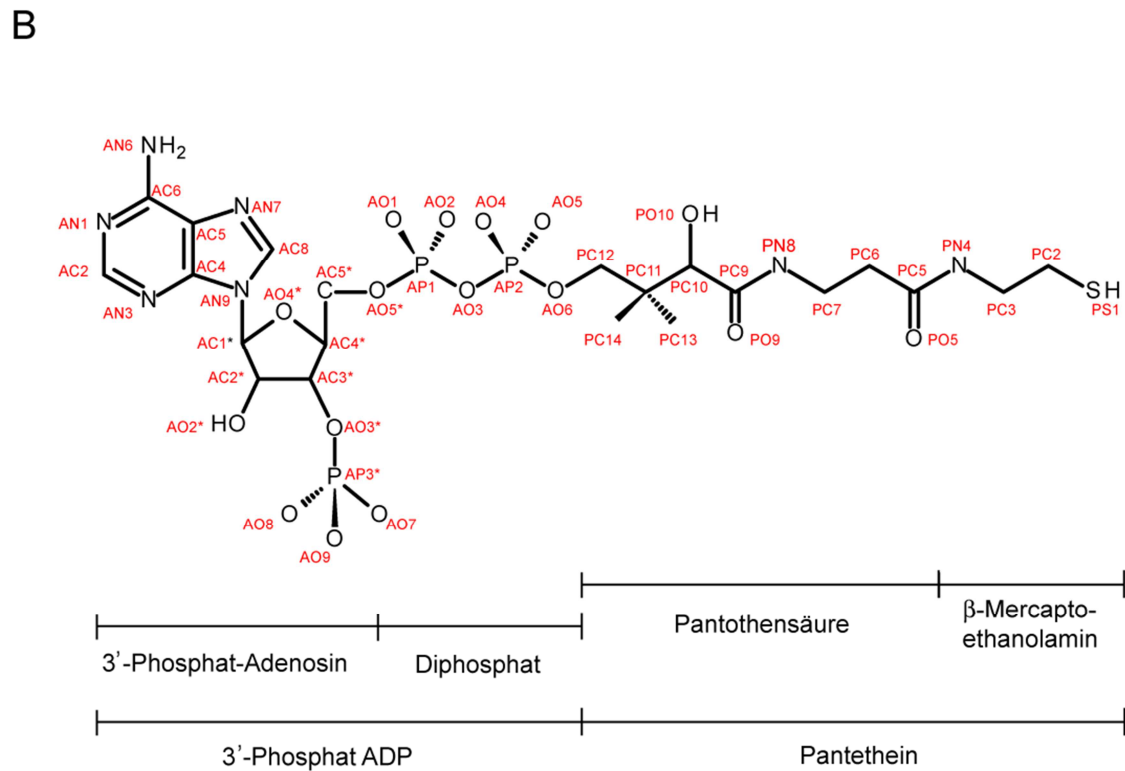
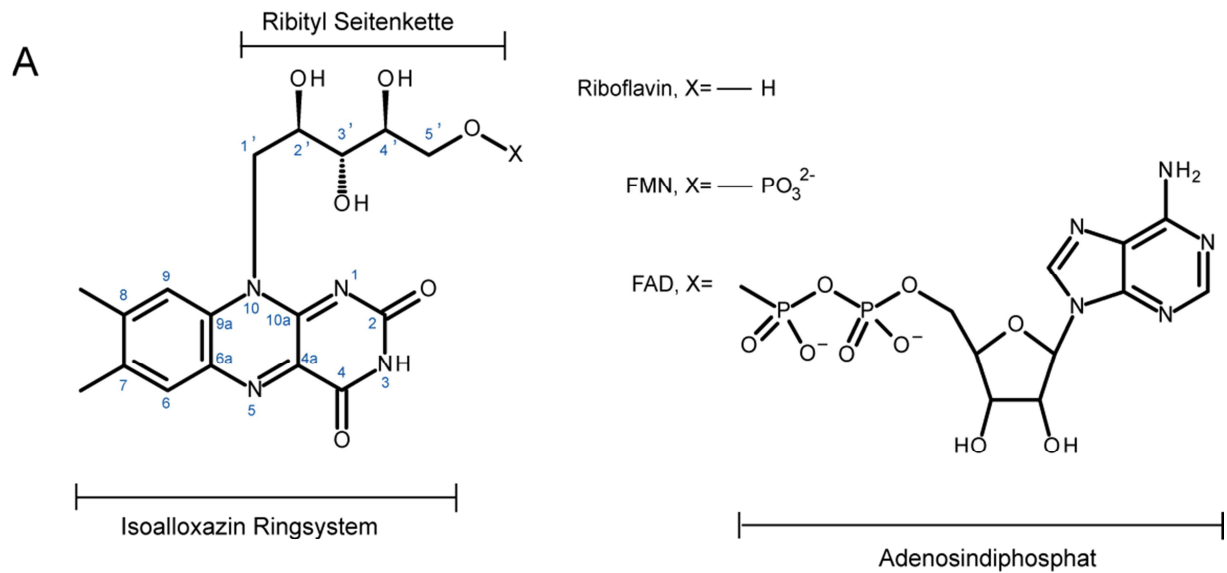
<i>Sc</i>	<i>Streptomyces coelicolor</i>
SC	Sigma Cryo Kristallisationsscreen
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SE	Sigma Extension Kristallisationsscreen
SNP	Sodium-Nitro-Prussit $\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TNB	2-nitro-5-thiobenzoat
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
<i>Tth</i>	<i>Thermus thermophilus</i>
U	Unit, Einheit der Enzymaktivität (μmol Umsatz/min)
ÜN	über Nacht
UV	Ultraviolett
VIS	engl: <i>visible</i>
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung

5.2 Aminosäuren

Aminosäure	3-Buchstaben- Code	1-Buchstaben- Code
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Aspartat	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamat	Glu	E
Glutamin	Gln	Q
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

5.3 Strukturformeln von Flavinen und CoA

Abgebildet sind die für diese Arbeit relevanten Strukturen der Kofaktoren Riboflavin, FMN, FAD sowie Coenzym A.



5.4 Dodecindaten

Angeben sind in dieser Tabelle wichtige Daten der Dodecine.

Organismus	Synonym	Gen-ID	M _w in Da ^{1,2}	Anzahl der AS ¹	pI ²
<i>Thermus thermophilus</i> HB8	Tthdode	TTHA1431	7616.7	69	5.9
	Tthdode W38F		7577.7	69	5.9
	Tthdode W38Y		7593.7	69	5.9
	Tthdode R65A		7531.6	69	5.4
	Tthdode R45A		7531.6	69	5.4
	Tthdode W38V		7529.6	69	5.9
	Tthdode Q57A		7559.6	69	5.9
	Tthdode W38A		7501.6	69	5.9
	Tthdode K6A		7559.6	69	5.4
	Tthdode R28A		7531.6	69	5.4
	Tthdode R28E		7589.6	69	5.4
	Tthdode R34A		7531.6	69	5.4
	Tthdode R34Q		7588.6	69	5.4
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37RV	Mtdode	Rv1498A	7497.4	70	5.8
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	Padode	PA0038	7731.6	71	6.5
<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)	Scdode	SCM10.03	7882.7	71	5.6

¹ berechnet unter der Annahme, dass die Startamino­säure Formyl-Methionin abgespalten wird.

² ermittelt mit Expasy ProtParam tool (<http://www.expasy.ch/>)

5.5 Oligonukleotide

In folgender Tabelle sind die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide aufgeführt.

<i>Name</i>	<i>Sequenz</i>	<i>Schnitt- stelle</i>	<i>Mismat- ches</i>	<i>% GC</i>	<i>T_M in °C</i>	<i>Länge in b</i>	<i>Zweck</i>
dodetth.up	gcc <u>gcc atg ggc</u> aag gtc tac aag aag g	NcoI	-	60.7	60.7 ¹⁾	28	Klonierungs- primer
dodetth.down1	cgg <u>ctc gag</u> cta agt ctc ttc caa gcg gaa c	XhoI	-	58.0	61.9 ¹⁾	31	Klonierungs- primer
mtdode.up	c ggg atc <u>ctc atg agc</u> aat cac acc tac cg	BspHI	-	56.7	60.6 ¹⁾	30	Klonierungs- primer
mtdode.low1	g gga att <u>ctc gag</u> tta tca gga atc ctc cag gcg	XhoI	-	52.9	61.7 ¹⁾	34	Klonierungs- primer
Padode.up	cgc <u>cac atg tcc</u> aat cac cac acc tac aag	PciI	-	53.3	59.3 ¹⁾	30	Klonierungs- primer
Padode.down	ggc <u>ctc gag</u> tca gct att ggc gat acg g	XhoI	-	60.7	60.7 ¹⁾	28	Klonierungs- primer
Scdode.up	gg <u>cac atg tcg</u> aac cac acc tac cg	PciI	-	60.0	57.5 ¹⁾	25	Klonierungs- primer
Scdode.down	cat <u>ctc gag</u> tca gtc gga ctc ctc cag	XhoI	-	59.3	59.2 ¹⁾	27	Klonierungs- primer
Tthdode W38Y down	g gat ctc ctt cac ctc aaa gta gtc cag gtg gcg c	-	2	57.1	81.9 ²⁾	35	Mutagenese- primer
Tthdode W38Y up	g cgc cac ctg gac tac ttt gag gtg aag gag atc c	-	2	57.1	81.9 ²⁾	35	Mutagenese- primer
Tthdode W38F down	g gat ctc ctt cac ctc aaa gaa gtc cag gtg gcg c	-	2	57.1	81.9 ²⁾	35	Mutagenese- primer
Tthdode W38F up	g cgc cac ctg gac ttc ttt gag gtg aag gag atc c	-	2	57.1	81.9 ²⁾	35	Mutagenese- primer
Tthdode W38V down	g gat ctc ctt cac ctc aaa cac gtc cag gtg gcg	-	2	58.8	81.7 ²⁾	34	Mutagenese- primer
Tthdode W38V up	cgc cac ctg gac gtg ttt gag gtg aag gag atc c	-	2	58.8	81.7 ²⁾	34	Mutagenese- primer

Tthdode W38A down	g gat ctc ctt cac ctc aaa cg c gtc cag gtg gcg	-	2	61.8	82.8 ²⁾	34	Mutagenese- primer
Tthdode W38A up	cgc cac ctg gac gcg ttt gag gtg aag gag atc c	-	2	61.8	82.9 ²⁾	34	Mutagenese- primer
Tthdode Q57A down	c cac ctc cag gac cac cg c gta ctc ctt cac c	-	2	65.6	82.2 ²⁾	32	Mutagenese- primer
Tthdode Q57A up	g gtg aag gag tac gcg gtg gtc ctg gag gtg g	-	2	65.6	82.2 ²⁾	32	Mutagenese- primer
Tthdode R45A down	cgc ctc gcc gat <u>ggt</u> <u>acc</u> cg c gat ctc ctt cac c	KpnI	3	67.6	82.4 ²⁾	34	Mutagenese- primer
Tthdode R45A up	g gtg aag gag atc gcg <u>ggt</u> <u>acc</u> atc ggcgag gcg	KpnI	3	67.6	82.4 ²⁾	34	Mutagenese- primer
Tthdode R65A down	cta agt ctc ttc caa ggc gaa ccc cac ctc cag	-	2	57.6	80.0 ²⁾	33	Mutagenese- primer
Tthdode R65A up	ctg gag gtg ggg ttc ggc ttg gaa gag act tag	-	2	57.6	80.0 ²⁾	33	Mutagenese- primer
Tthdode_K6A. up	g ggc aag gtc tac gcg aag gtg gag ctc gtg	-	2	64.5	79.8 ²⁾	31	Mutagenese- primer
Tthdode_K6A. down	cac gag ctc cac ctt cg c gta gac ctt gcc c	-	2	64.5	79.8 ²⁾	31	Mutagenese- primer
Tthdode_R28A. up	cc ttg gcg gcg gcg cgg aag acc ctg	-	2	76.9	79.4 ²⁾	26	Mutagenese- primer
Tthdode_R28A. down	cag ggt ctt ccg cgc cg c cgc caa gg	-	2	76.9	79.4 ²⁾	26	Mutagenese- primer
Tthdode_R28E. up	gcc gcc ttg gcg gaa gcg cgg aag acc ctg	-	3	73.3	80.4 ²⁾	30	Mutagenese- primer
Tthdode_R28E. down	cag ggt ctt ccg cgc ttc cgc caa ggc ggc	-	3	73.3	80.4 ²⁾	30	Mutagenese- primer
Tthdode_R34Q. up	cgg aag acc <u>ctg</u> cag cac ctg gac tgg ttt gag	PstI	2	60.6	79.7 ²⁾	33	Mutagenese- primer
Tthdode_R34Q. down	ctc aaa cca gtc cag gtg <u>ctg</u> cag ggt ctt ccg	PstI	2	60.6	79.7 ²⁾	33	Mutagenese- primer
Tthdode_R34A. up	gg aag acc ctg gcc cac ctg gac tgg ttt gag	-	2	62.5	79.8 ²⁾	32	Mutagenese- primer
Tthdode_R34A. down	ctc aaa cca gtc cag	-	2	62.5	79.8 ²⁾	32	Mutagenese-

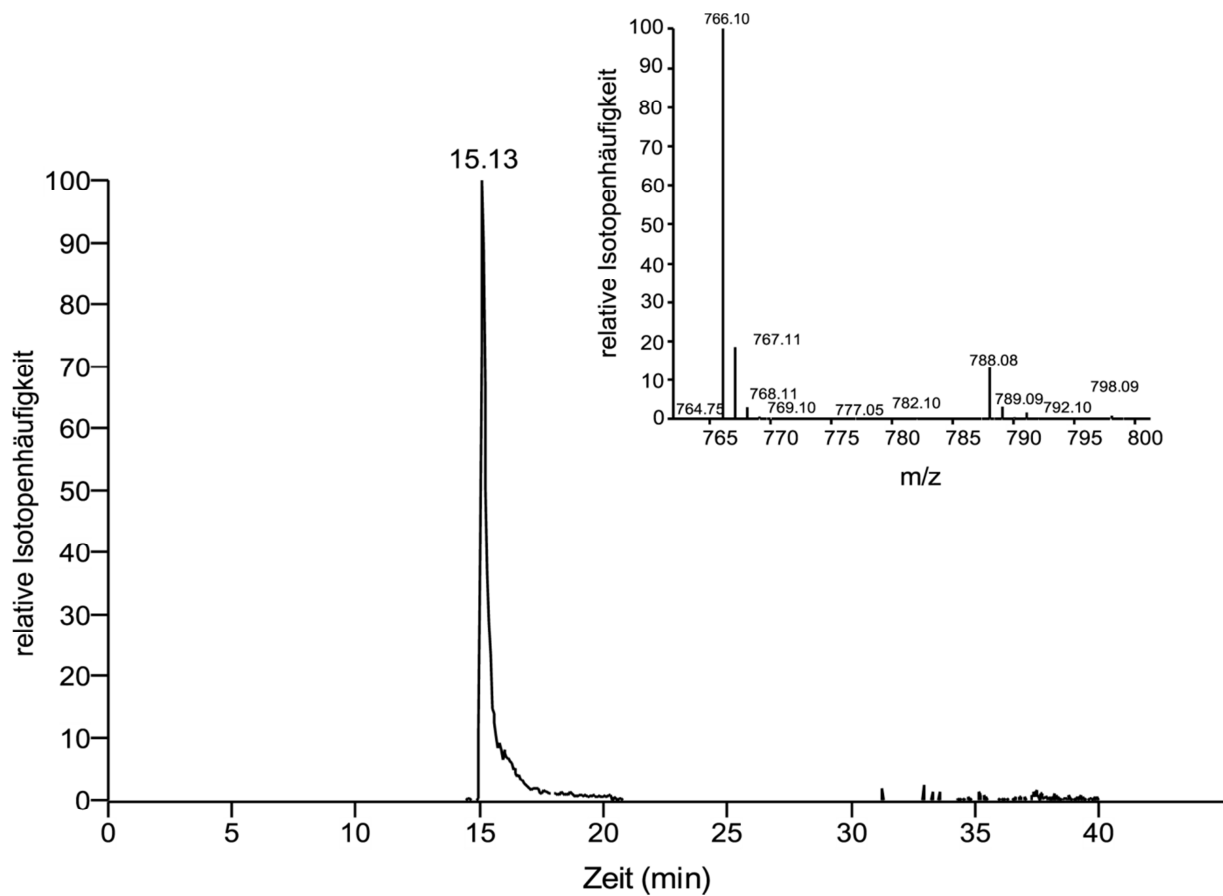
down	gtg ggc cag ggt ctt cc						primer
padode1c	gacc gaattccatgcaggtct tcgaactgg	EcoRI	-	53.3	59.1 ¹⁾	30	Klonierungs- primer
padode2c	cacctctagaccgtagatgg cacgctttc	XbaI	-	53.3	59.1 ¹⁾	30	Klonierungs- primer
padode3	gaac actag tgaactctctcc ccggacg	SpeI	-	57.1	59.1 ¹⁾	28	Klonierungs- primer
padode4	ggatatccat atgtggc acc tggaaacctg	NdeI	-	51.6	59.4 ¹⁾	31	Klonierungs- primer
gmcassup	ggaattccat atgcggttc gg ccagcggaag	NdeI	-	59.4	63.1 ¹⁾	32	Klonierungs- primer
gmcassdown	gaaactagtc ccgaaca ctc cgcgcccggaag	SpeI	-	60.6	64.4 ¹⁾	33	Klonierungs- primer

Schnittstellen für Restriktionsendonucleasen sind unterstrichen, mutierte Codons fett hervorgehoben.

¹⁾ berechnet nach: $T_M = 59.9 + 0.41(\%GC) - \frac{675}{N}$

²⁾ berechnet nach: $T_M = 81.5 + 0.41(\%GC) - \frac{675}{N - \%mismatch}$

5.6 Massenspektrum zum Nachweis der Bindung von CoA im *M. tuberculosis* Dodecin



Obige Abbildung zeigt ein Massenspektrum des Kofaktorextraktes des *M. tuberculosis* Dodecins nach TCA-Fällung. Hiermit kann die Anwesenheit von CoA in seiner oxidierten dimeren Form nachgewiesen werden.

5.7 Verwendete Kristallisationsscreens

5.7.1 Sigma Basic

<i>Lösung</i>	<i>Salz</i>	<i>Puffer</i>	<i>Fällungsmittel</i>
1	Ca-chloride 0.02 M	Na-acetate (pH 4.6) 0.1 M	2-Methyl-2,4-pentanediol 30 %
2	K-, Na-tartrate 0.4 M	-	-
3	NH ₄ -dihydrogenphosphate 0.4 M	-	-
4	NH ₄ -sulfate 2.0 M	Tris/HCl (pH 8.5), 0.1 M	
5	Na-citrate 0.2 M	HEPES Na-salt (pH 7.5), 0.1 M	2-Methyl-2,4-pentanediol 30 %
6	Mg-chloride 0.2 M	Tris/HCl (pH 8.5), 0.1 M	PEG 4000 30 %
7	Na-acetate 1.4 M	Na-cacodylat (pH 6.5), 0.1 M	-
8	Na-citrate 0.2 M	Na-cacodylat (pH 6.5), 0.1 M	2-Propanol 30 %
9	NH ₄ -acetate 0.2 M	Na-citrate (pH5.6), 0.1 M	PEG 4000 30 %
10	NH ₄ -acetate 0.2 M	Na-acetate (pH 4.6), 0.1 M	PEG 4000 30 %
11	NH ₄ -dihydrogenphosphat 1.0 M	Na-citrate (pH5.6), 0.1 M	-
12	Mg-chloride 0.2 M	HEPES Na-salt (pH 7.5), 0.1 M	2-Propanol 30 %
13	Na-citrate 0.2 M	Tris/HCl (pH 8.5), 0.1 M	PEG 400 30 %
14	Ca-chloride 0.2 M	HEPES Na-salt (pH 7.5), 0.1 M	PEG 400 28 %
15	NH ₄ -sulfate 2.0 M	Na-cacodylat (pH 6.5), 0.1 M	PEG 8000 30 %
16	Li-sulfate 1.5 M	HEPES Na-salt (pH 7.5), 0.1 M	-
17	Li-sulfate 0.2 M	Tris/HCl (pH 8.5), 0.1 M	PEG 4000 30 %
18	Mg-Acetate 0.2 M	Na-cacodylat (pH 6.5), 0.1 M	PEG 8000 20 %
19	NH ₄ -acetate 0.2 M	Tris/HCl (pH 8.5), 0.1 M	2-Propanol 30 %
20	NH ₄ -sulfate 0.2 M	Na-acetate (pH 4.6), 0.1 M	PEG 4000 25 %
21	Mg-acetate 0.2 M	Na-cacodylat (pH 6.5), 0.1 M	2-Methyl-2,4-pentanediol 30 %
22	Na-acetate 0.2 M	Tris/HCl (pH 8.5), 0.1 M	PEG 4000 30 %
23	Mg-chloride 0.2 M	HEPES Na-salt (pH 7.5), 0.1 M	30 % v/v PEG 400
24	Ca-chloride 0.2 M	Na-acetate (pH 4.6), 0.1 M	2-Propanol 20 %
25	Na-acetate 1.0 M	Imidazole (pH 6.5) 0.1 M	-
26	NH ₄ -acetate 0.2 M	Na-citrate (pH5.6), 0.1 M	2-Methyl-2,4-pentanediol 30 %
27	Na-citrate 0.2 M	HEPES Na-salt (pH 7.5), 0.1 M	2-Propanol 20 %
28	Na-acetate 0.2 M	Na-cacodylat (pH 6.5), 0.1 M	PEG 8000 30 %
29	K-, Na-tartrate 0.8 M	HEPES Na-salt (pH 7.5), 0.1 M	-
30	NH ₄ -sulfate 0.2 M	-	PEG 8000 30 %
31	NH ₄ -sulfate 0.2 M	-	PEG 4000 30 %
32	NH ₄ -sulfate 2 M	-	-
33	Na-formiate 4 M	-	-
34	Na-formiate 2 M	Na-acetate (pH 4.6), 0.1 M	-
35	K-/Na-dihydrogenphosphate 0.8 M	HEPES Na-salt (pH 7.5), 0.1 M	-
36	-	Tris/HCl (pH 8.5), 0.1 M	PEG 8000 8 %
37	-	Na-acetate (pH 4.6), 0.1 M	PEG 4000 8 %
38	Na-citrate 1.4 M	HEPES Na-salt (pH 7.5), 0.1 M	-
39	NH ₄ -sulfate 2.0 M	HEPES Na-salt (pH 7.5), 0.1 M	PEG 400 2 %
40	-	Na-citrate (pH5.6), 0.1 M	2-Propanol 20 %, PEG 4000 20 %
41	-	HEPES Na-salt (pH 7.5), 0.1 M	2-Propanol 10 %, PEG 4000 20 %
42	K-dihydrogenphosphate 0.05 M	-	PEG 8000 20 %
43	-	-	PEG 1500 30 %
44	Mg-formiate 0.2 M	-	-
45	Zn-acetate 0.2 M	Na-cacodylat (pH 6.5), 0.1 M	PEG 8000 18 %
46	Ca-acetate 0.2 M	Na-cacodylat (pH 6.5), 0.1 M	PEG 8000 18 %
47	NH ₄ -sulfate 2.0 M	Na-acetate (pH 4.6), 0.1 M	-
48	NH ₄ -dihydrogenphosphate 2.0 M	Tris/HCl (pH 8.5), 0.1 M	-

49	Li-sulfate 1.0 M	-	PEG 8000 2 %
50	Li-sulfate 0.5 M	-	PEG 8000 15 %

5.7.2 Sigma Extension

<i>Lösung</i>	<i>Salz</i>	<i>Puffer</i>	<i>Fällungsmittel</i>
1	Na-chloride 2M	-	PEG 6000 10 %
2	Na-chloride 0.5 M	Mg-chloride 0.01 M	CTAB 0.01 M
3			Ethylene glycol 25 %
4			Dioxan 35 %
5	NH ₄ -sulfate 2 M		2-Propanol 5 %
6		Imidazole (pH 7) 1 M	
7			PEG 1000 10 %, PEG 8000 10 %
8	Na-chloride 1.5 M		Ethanol 10 %
9	Na-chloride 2 M	Na-acetate (pH4.6), 0.1 M	-
10	Na-chloride 0.2 M	Na-acetate (pH4.6), 0.1 M	2-Methyl-2,4-pentanediol 30 %
11	Co-chloride 0.1 M	Na-acetate (pH4.6), 0.1 M	1,6-Hexanediol 1 M
12	Cd-chloride 0.1 M	Na-acetate (pH4.6), 0.1 M	PEG 400 30 %
13	NH ₄ -sulfate 0.2 M	Na-acetate (pH4.6), 0.1 M	PEG MME 2000 30 %
14	K-, Na-tartrate 0.2 M	Na-citrate (pH 5.6) 0.1 M	NH ₄ -sulfate 2 M
15	Li-sulfate 1 M	Na-citrate (pH 5.6) 0.1 M	NH ₄ -sulfate 0.5 M
16	Na-chloride 0.5 M	Na-citrate (pH 5.6) 0.1 M	Polyethylenimin 2%
17		Na-citrate (pH 5.6) 0.1 M	tert.-Butanol 35 %
18	Fe(III)-chloride 0.01 M	Na-citrate (pH 5.6) 0.1 M	Jeffamine M-600 10 %
19		Na-citrate (pH 5.6) 0.1 M	1,6-Hexandiol 2.5 M
20		MES (pH 6.5) 0.1 M	Mg-sulfate 1.6 M
21	K-,Na-dihydrogenphosphate 0.1 M each	MES (pH 6.5) 0.1 M	Na-chloride 2 M
22		MES (pH 6.5) 0.1 M	PEG 20000 12 %
23	1.6 M (NH ₄)SO ₄	MES (pH 6.5) 0.1 M	10 % v/v Dioxan
24	Cs-chloride 0.05 M	MES (pH 6.5) 0.1 M	Jeffamine M-600 12 %
25	Co-chloride 0.1 M	MES (pH 6.5) 0.1 M	NH ₄ -sulfate 1.8 M
26	NH ₄ -sulfate 0.2 M	MES (pH 6.5) 0.1 M	PEG MME 5000 30 %
27	Zn-sulfate 0.01 M	MES (pH 6.5) 0.1 M	PEG MME 550 25 %
28		Na-citrate (pH6.5) 1.6 M	
29	NH ₄ -sulfate 0.5 M	HEPES (pH 7.5) 1.5 M	2-Methyl-2,4-pentanediol 30 %
30		HEPES (pH 7.5) 1.5 M	2-Methyl-2,4-pentanediol 5 %, PEG 6000 10 %
31		HEPES (pH 7.5) 1.5 M	Jeffamine M-600 20 %
32	Na-chloride 0.1 M	HEPES (pH 7.5) 1.5 M	NH ₄ -sulfate 1.6 M
33		HEPES (pH 7.5) 1.5 M	NH ₄ -Formate 2.0 M
34	Cd-sulfate 0.05 M, Na-acetate 1.0 M	HEPES (pH 7.5) 1.5 M	
35		HEPES (pH 7.5) 1.5 M	2-Methyl-2,4-pentanediol 70 %
36		HEPES (pH 7.5) 1.5 M	Na-chloride 4.3 M
37		HEPES (pH 7.5) 1.5 M	Ethylene glycol 8 %, PEG 8000 10 %
38		HEPES (pH 7.5) 1.5 M	PEG 10000 20 %
39	Mg-chloride 0.2 M	Tris/HCl (pH 8.5) 0.1 M	1,6-Hexanediol 3.4 M
40		Tris/HCl (pH 8.5) 0.1 M	tert.-Butanol 25 %
41	Li-sulfate 1 M, Ni(II)-chloride 0.01 M	Tris/HCl (pH 8.5) 0.1 M	
42	NH ₄ -sulfate 1.5 M	Tris/HCl (pH 8.5) 0.1 M	Glycerol 12 %
43	NH ₄ -phosphate 0.2 M	Tris/HCl (pH 8.5) 0.1 M	2-Methyl-2,4-pentanediol 50 %
44		Tris/HCl (pH 8.5) 0.1 M	Ethanol 20 %
45	Ni(II)-chloride 0.01 M	Tris/HCl (pH 8.5) 0.1 M	PEG MME 2000 20 %
46	Na-chloride 0.1 M	Bicine (pH 9.0), 0.1 M	PEG MME 550 20 %
47	Mg-chloride 2 M	Bicine (pH 7.5) 0.1 M	
48		Bicine (pH 9.0), 0.1 M	Dioxane 2 %, PEG 20000 10 %
49	Mg-chloride 0.1 M	Tris/HCl (pH 8.5) 0.1 M	PEG 20000 15 %
50			PEG 20000 20 %

5.7.3 Sigma Cryo

<i>Lösung</i>	<i>Salz</i>	<i>Puffer</i>	<i>Fällungsmittel, Kryoprotectant</i>
1	Ca-chloride 0.02 M	Na-acetate (pH 4.3) 0.1 M	2-Methyl-2,4-pentanediol 30 %
2	K-, Na-tartrate 0.26 M	-	Glycerol 35 %
3	NH ₄ -dihydrogenphosphate 0.26 M	-	Glycerol 35 %
4	NH ₄ -sulfate 1.5 M	Tris/HCl (pH 8.5), 0.075 M	Glycerol 25 %
5	Na-citrate 0.2 M	HEPES Na-salt (pH 7.5), 0.1 M	2-Methyl-2,4-pentanediol 30 %
6	Mg-chloride 1.6 M	Tris/HCl (pH 8.5), 0.08 M	PEG 4000 24 %, Glycerol 20 %
7	Na-acetate 0.98 M	Na-cacodylat (pH 6.5), 0.07 M	Glycerol 30 %
8	Na-citrate 0.14 M	Na-cacodylat (pH 6.5), 0.07 M	2-Propanol 21 %, Glycerol 30 %
9	NH ₄ -acetate 0.17 M	Na-citrate (pH 5.6), 0.085 M	PEG 4000 25.5 %, Glycerol 15 %
10	NH ₄ -acetate 0.17 M	Na-acetate (pH 4.6), 0.085 M	PEG 4000 25.5 %, Glycerol 15 %
11	NH ₄ -dihydrogenphosphat 0.7 M	Na-citrate (pH 5.6), 0.07 M	Glycerol 30 %
12	Mg-chloride 0.18 M	HEPES Na-salt (pH 7.5), 0.09 M	2-Propanol 27 %, Glycerol 10 %
13	Na-citrate 0.2 M	Tris/HCl (pH 8.5), 0.1 M	PEG 400 30 %
14	Ca-chloride 0.19 M	HEPES Na-salt (pH 7.5), 0.095 M	PEG 400 26.6 %, Glycerol 5 %
15	NH ₄ -sulfate 0.17 M	Na-cacodylat (pH 6.5), 0.085 M	PEG 8000 25.5 %, Glycerol 15 %
16	Li-sulfate 1.125 M	HEPES Na-salt (pH 7.5), 0.075 M	Glycerol 25 %
17	Li-sulfate 0.17 M	Tris/HCl (pH 8.5), 0.085 M	PEG 4000 25.5 %, Glycerol 15 %
18	Mg-Acetat 0.16 M	Na-cacodylat (pH 6.5), 0.08 M	PEG 8000 16 %, Glycerol 20 %
19	NH ₄ -acetate 0.16 M	Tris/HCl (pH 8.5), 0.08 M	2-Propanol 24 %, Glycerol 20 %
20	NH ₄ -sulfate 0.16 M	Na-acetate (pH 4.6), 0.08 M	PEG 4000 20 %, Glycerol 20 %
21	Mg-acetate 0.2 M	Na-cacodylat (pH 6.5), 0.1 M	2-Methyl-2,4-pentanediol 30 %
22	Na-acetate 0.17 M	Tris/HCl (pH 8.5), 0.085 M	PEG 4000 25.5 %, Glycerol 15 %
23	Mg-chloride 0.2 M	HEPES Na-salt (pH 7.5), 0.1 M	30 % v/v PEG 400
24	Ca-chloride 0.14 M	Na-acetate (pH 4.6), 0.07 M	2-Propanol 14 %, Glycerol 30 %
25	Na-acetate 0.7 M	Imidazole (pH 6.5) 0.07 M	Glycerol 30%
26	NH ₄ -acetate 0.2 M	Na-citrate (pH 5.6), 0.1 M	2-Methyl-2,4-pentanediol 30 %
27	Na-citrate 0.14 M	HEPES Na-salt (pH 7.5), 0.07 M	2-Propanol 14 %, Glycerol 30 %
28	Na-acetate 0.17 M	Na-cacodylat (pH 6.5), 0.085 M	PEG 8000 25.5 %, Glycerol 15 %
29	K-, Na-tartrate 0.52 M	HEPES Na-salt (pH 7.5), 0.065 M	Glycerol 35 %
30	NH ₄ -sulfate 0.17 M	-	PEG 8000 25.5 %, Glycerol 15 %
31	NH ₄ -sulfate 0.17 M	-	PEG 4000 25.5 %, Glycerol 15 %
32	NH ₄ -sulfate 1.5 M	-	Glycerol 25 %
33	Na-formate 3.6 M	-	Glycerol 10 %
34	Na-formate 1.4 M	Na-acetate (pH 4.6), 0.07 M	Glycerol 30 %
35	K-/Na-dihydrogenphosphate 0.6 M	HEPES Na-salt (pH 7.5), 0.075 M	Glycerol 25 %
36	-	Tris/HCl (pH 8.5), 0.065 M	PEG 8000 5.2 %, Glycerol 35 %
37	-	Na-acetate (pH 4.6), 0.07 M	PEG 4000 5.6 %, Glycerol 30 %
38	Na-citrate 1.26 M	HEPES Na-salt (pH 7.5), 0.09 M	Glycerol 10 %
39	NH ₄ -sulfate 1.7 M	HEPES Na-salt (pH 7.5), 0.085 M	PEG 400 1.7 %, Glycerol 15 %
40	-	Na-citrate (pH 5.6), 0.095 M	2-Propanol 19 %, PEG 4000 19 %, Glycerol 5 %
41	-	HEPES Na-salt (pH 7.5), 0.085 M	2-Propanol 8.5 %, PEG 4000 17 %, Glycerol 15 %
42	K-dihydrogenphosphate 0.04 M	-	PEG 8000 16 %, Glycerol 20 %
43	-	-	PEG 1500 24 %, Glycerol 20 %
44	Mg-formiate 0.1 M	-	Glycerol 50 %
45	Zn-acetate 0.16 M	Na-cacodylat (pH 6.5), 0.08 M	PEG 8000 14.4 %, Glycerol 20 %
46	Ca-acetate 0.16 M	Na-cacodylat (pH 6.5), 0.08 M	PEG 8000 14.4 %, Glycerol 20 %
47	NH ₄ -sulfate 1.6 M	Na-acetate (pH 4.6), 0.08 M	Glycerol 20 %
48	NH ₄ -dihydrogenphosphate 1.6 M	Tris/HCl (pH 8.5), 0.08 M	Glycerol 20 %
49	Li-sulfate 0.8 M	-	PEG 8000 1.6 %, Glycerol 20 %
50	Li-sulfate 0.4 M	-	PEG 8000 12 %, Glycerol 20 %

5.7.4 Nextal Classic

<i>Lösung</i>	<i>Salz</i>	<i>Puffer</i>	<i>Fällungsmittel</i>
1	Co-chloride 0.01 M	Na-acetate (pH4.6) 0.1 M	1,6-Hexanediol 1.0 M
2	-	Na-citrate (pH 5.6), 0.1 M	1,6-Hexanediol 2.5 M
3	Mg-chloride 0.2 M	Tris/HCl (pH 8.5), 0.1 M	1,6-Hexanediol, 3.4 M
4	-	-	2-Propanol 5 %, NH ₄ -sulfate 2.0 M
5	-	HEPES (pH 7.5), 0.1 M	2-Propanol 10 %, PEG 4000 20 %
6	Ca-chloride 0.2 M	Na-acetate (pH 4.6), 0.1 M	2-Propanol 20 %
7	-	Na-citrate (pH 5.6) 0.1 M	2-Propanol 20 %, PEG 4000 20 %
8	Na-citrate 0.2 M	HEPES (pH 7.5), 0.1 M	2-Propanol 20 %
9	Na-citrate 0.2 M	Na-cacodylat (pH 6.5) 0.1 M	2-Propanol 30 %
10	Mg-chloride 0.2 M	HEPES (pH 7.5), 0.1 M	2-Propanol 30 %
11	NH ₄ -acetate 0.2 M	Tris/HCl (pH 8.5), 0.1 M	2-Propanol 30 %
12	-	-	Ethanol 10 %, Na-chloride 1.5 M
13	-	Tris/HCl (pH 8.5), 0.1 M	Ethanol 20 %
14	-	-	Ethylenglycol 25 %
15	Ca-chloride 0.02 M	Na-acetat (pH4.6), 0.1 M	2-Methyl-2,4-pentanediol 30 %
16	Na-chloride 0.2 M	Na-acetat (pH4.6), 0.1 M	2-Methyl-2,4-pentanediol 30 %
17	NH ₄ -acetat 0.2 M	Na-citrate (pH 5.6) 0.1 M	2-Methyl-2,4-pentanediol 30 %
18	Mg-acetate 0.2 M	Na-cacodylat (pH 6.5) 0.1 M	2-Methyl-2,4-pentanediol 30 %
19	Na-citrate 0.2 M	HEPES (pH 7.5), 0.1 M	2-Methyl-2,4-pentanediol 30 %
20	NH ₄ -sulfate 0.5 M	HEPES (pH 7.5), 0.1 M	2-Methyl-2,4-pentanediol 30 %
21	NH ₄ -phosphate 0.2 M	Tris/HCl (pH 8.5), 0.1 M	2-Methyl-2,4-pentanediol 50 %
22	-	HEPES (pH 7.5), 0.1 M	2-Methyl-2,4-pentanediol 70 %
23	-	Tris/HCl (pH 8.5), 0.1 M	tert-Butanol 25 %
24	-	Na-citrate (pH 5.6) 0.1 M	tert-Butanol 35 %
25	-	-	NH ₄ -phosphate 0.4 M
26	-	Na-citrate (pH 5.6) 0.1 M	NH ₄ -phosphate 1.0 M
27	-	Tris/HCl (pH 8.5), 0.1 M	NH ₄ -phosphate 2.0 M
28	-	HEPES (pH 7.5), 0.1 M	NH ₄ -formate 2.0 M
29	-	Na-acetat (pH4.6), 0.1 M	NH ₄ -sulfate 2.0 M
30	-	Tris/HCl (pH 8.5), 0.1 M	NH ₄ -sulfate 2.0 M
31	-	-	NH ₄ -sulfate 2.0 M
32	Na-chloride 0.1 M	HEPES (pH 7.5), 0.1 M	NH ₄ -sulfate 1.6 M
33	Co-chloride 0.01 M	MES (pH 6.5) 0.1 M	NH ₄ -sulfate 1.8 M
34	K-,Na-tartrate 0.2 M	Na-citrate (pH 5.6) 0.1 M	NH ₄ -sulfate 2.0 M
35	-	-	Imidazole (pH 7.0), 1.0 M
36	-	-	K-,Na-tartrate 0.4 M
37	-	HEPES (pH 7.5), 0.1 M	K-,Na-tartrate 0.8 M
38	-	Imidazole (pH 6.5), 0.1 M	Na-acetate 1.0 M
39	Cd-sulfate 0.05 M	HEPES (pH 7.5), 0.1 M	Na-acetate 1.0 M
40	-	Na-cacodylat (pH 6.5) 0.1 M	Na-acetate 1.4 M
41	-	Na-acetat (pH4.6), 0.1 M	Na-chloride 2.0 M
42	Na-phosphate 0.1 M, K-phosphate 0.1 M	MES (pH 6.5) 0.1 M	Na-chloride 2.0 M
43	-	HEPES (pH 7.5), 0.1 M	Na-chloride 4.3 M
44	-	HEPES (pH 7.5), 0.1 M	Na-citrat 1.4 M
45	-	-	Na-citrat 1.6 M (pH 6.5)
46	-	HEPES (pH 7.5), 0.1 M	Na-phosphate 0.8 M, K-phosphate 0.8 M
47	-	Na-acetat (pH4.6), 0.1 M	Na-formate 2 M
48	-	-	Na-formate 4 M
49	-	BICINE (pH 9.0) 0.1 M	Dioxane 2%, PEG 20000 10 %
50	-	MES (pH 6.5) 0.1 M	Dioxane 10 %, NH ₄ -sulfate 1.6 M
51	-	-	Dioxane 35 %
52	Na-chloride 0.5 M	Na-citrate (pH 5.6) 0.1 M	Ethylene imin 2 %

53	-	Tris/HCl (pH 8.5), 0.1 M	Glycerol 12 %, NH ₄ -sulfate 1.5 M
54	Mg-chloride 0.01 M, CTAB 0.01 M	-	Na-chloride 0.5 M
55	Fe(III)-chloride 0.01 M	Na-citrate (pH 5.6) 0.1 M	Jeffamine M-600 10 %
56	-	HEPES (pH 7.5), 0.1 M	Jeffamine M-600 20 %
57	NH ₄ -sulfate 0.5 M	Na-citrate (pH 5.6) 0.1 M	Li-sulfate 1.0 M
58	Ni-chloride 0.01 M	Tris/HCl (pH 8.5), 0.1 M	Li-sulfate 1.0 M
59	-	HEPES (pH 7.5), 0.1 M	Li-sulfate 1.5 M
60	-	BICINE (pH 9.0) 0.1 M	Mg-chloride 2.0 M
61	-	-	Mg-formate 0.2 M
62	-	MES (pH 6.5) 0.1 M	Mg-sulfate 1.6 M
63	-	Tris/HCl (pH 8.5), 0.1 M	PEG 8000 8 %
64	-	HEPES (pH 7.5), 0.1 M	PEG 8000 10 %
65	Li-sulfate 0.5 M	-	PEG 8000 15 %
66	Zn-acetate 0.2 M	Na-cacodylat (pH 6.5) 0.1 M	PEG 8000 18 %
67	Ca-acetate 0.2 M	Na-cacodylat (pH 6.5) 0.1 M	PEG 8000 18 %
68	Mg-acetate 0.2 M	Na-cacodylat (pH 6.5) 0.1 M	PEG 8000 20 %
69	K-phosphate 0.05 M	-	PEG 8000 20 %
70	NH ₄ -sulfate 0.2 M	Na-cacodylat (pH 6.5) 0.1 M	PEG 8000 30 %
71	Na-acetate 0.2 M	Na-cacodylat (pH 6.5) 0.1 M	PEG 8000 30 %
72	NH ₄ -sulfate 0.2 M	-	PEG 8000 30 %
73	-	HEPES (pH 7.5), 0.1 M	PEG 400 2 %, NH ₄ -sulfate 2.0 M
74	Ca-chloride 0.2 M	HEPES (pH 7.5), 0.1 M	PEG 400 28 %
75	Cd-chloride 0.1 M	Na-acetat (pH4.6), 0.1 M	PEG 400 30 %
76	Mg-chloride 0.2 M	HEPES (pH 7.5), 0.1 M	PEG 400 30 %
77	Na-citrate 0.2 M	Tris/HCl (pH 8.5), 0.1 M	PEG 400 30 %
78	Na-chloride 0.1 M	BICINE (pH 9.0) 0.1 M	PEG 550 MME 20 %
79	Zn-sulfate 0.01 M	MES (pH 6.5) 0.1 M	PEG 550 MME 25 %
80	-	-	PEG 1000 10 %, PEG 8000 10 %
81	-	-	PEG 1500 30 %
82	Ni-chloride 0.01 M	Tris/HCl (pH 8.5), 0.1 M	PEG 2000 MME 20 %
83	NH ₄ -sulfate 0.2 M	Na-acetat (pH4.6), 0.1 M	PEG 2000 MME 30 %
84	-	Na-acetat (pH4.6), 0.1 M	PEG 4000 8 %
85	NH ₄ -sulfate 0.2 M	Na-acetat (pH4.6), 0.1 M	PEG 4000 25 %
86	NH ₄ -acetate 0.2 M	Na-acetat (pH4.6), 0.1 M	PEG 4000 30% w/v
87	NH ₄ -acetate 0.2 M	Na-citrate (pH 5.6) 0.1 M	PEG 4000 30% w/v
88	Mg-chloride 0.2 M	Tris/HCl (pH 8.5), 0.1 M	PEG 4000 30% w/v
89	Li-sulfate 0.2 M	Tris/HCl (pH 8.5), 0.1 M	PEG 4000 30% w/v
90	Na-acetate 0.2 M	Tris/HCl (pH 8.5), 0.1 M	PEG 4000 30% w/v
91	NH ₄ -sulfate 0.2 M	-	PEG 4000 30% w/v
92	NH ₄ -sulfate 0.2 M	MES (pH 6.5) 0.1 M	PEG 5000 MME 30% w/v
93	-	HEPES (pH 7.5), 0.1 M	PEG 6000 10 %, MPD 5 %
94	-	-	PEG 6000 10 %, Na-chloride 2 M
95	-	HEPES (pH 7.5), 0.1 M	PEG 10000 20 %, Ethylenglycol 8 %
96	-	MES (pH 6.5) 0.1 M	PEG 20000 12 %

5.7.5 Nextal Classic Lite

<i>Lösung</i>	<i>Salz</i>	<i>Puffer</i>	<i>Fällungsmittel</i>
1	Co-chloride 0.01 M	Na-acetate (pH4.6) 0.1 M	1,6-Hexanediol 0.5 M
2	-	Na-citrate (pH 5.6), 0.1 M	1,6-Hexanediol 1.25 M
3	Mg-chloride 0.2 M	Tris/HCl (pH 8.5), 0.1 M	1,6-Hexanediol, 1.7 M
4	-	-	2-Propanol 2.5 %, NH ₄ -sulfate 1.0 M
5	-	HEPES (pH 7.5), 0.1 M	2-Propanol 5 %, PEG 4000 10 %

6	Ca-chloride 0.2 M	Na-acetate (pH 4.6), 0.1 M	2-Propanol 10 %
7	-	Na-citrate (pH 5.6), 0.1 M	2-Propanol 10 %, PEG 4000 10 %
8	Na-citrate 0.2 M	HEPES (pH 7.5), 0.1 M	2-Propanol 10 %
9	Na-citrate 0.2 M	Na-cacodylat (pH 6.5) 0.1 M	2-Propanol 15 %
10	Mg-chloride 0.2 M	HEPES (pH 7.5), 0.1 M	2-Propanol 15 %
11	NH ₄ -acetate 0.2 M	Tris/HCl (pH 8.5), 0.1 M	2-Propanol 15 %
12	-	-	Ethanol 5 %, Na-chloride 0.75 M
13	-	Tris/HCl (pH 8.5), 0.1 M	Ethanol 10 %
14	-	-	Ethylene glycol 12.5 %
15	Ca-chloride 0.02 M	Na-acetat (pH 4.6), 0.1 M	2-Methyl-2,4-pentanediol 15 %
16	Na-chloride 0.2 M	Na-acetat (pH 4.6), 0.1 M	2-Methyl-2,4-pentanediol 15 %
17	NH ₄ -acetat 0.2 M	Na-citrate (pH 5.6), 0.1 M	2-Methyl-2,4-pentanediol 15 %
18	Mg-acetate 0.2 M	Na-cacodylat (pH 6.5), 0.1 M	2-Methyl-2,4-pentanediol 15 %
19	Na-citrate 0.2 M	HEPES (pH 7.5), 0.1 M	2-Methyl-2,4-pentanediol 15 %
20	NH ₄ -sulfate 0.5 M	HEPES (pH 7.5), 0.1 M	2-Methyl-2,4-pentanediol 15 %
21	NH ₄ -phosphate 0.2 M	Tris/HCl (pH 8.5), 0.1 M	2-Methyl-2,4-pentanediol 25 %
22	-	HEPES (pH 7.5), 0.1 M	2-Methyl-2,4-pentanediol 35 %
23	-	Tris/HCl (pH 8.5), 0.1 M	tert-Butanol 12.5 %
24	-	Na-citrate (pH 5.6), 0.1 M	tert-Butanol 17.5 %
25	-	-	NH ₄ -phosphate 0.2 M
26	-	Na-citrate (pH 5.6), 0.1 M	NH ₄ -phosphate 0.5 M
27	-	Tris/HCl (pH 8.5), 0.1 M	NH ₄ -phosphate 1.0 M
28	-	HEPES (pH 7.5), 0.1 M	NH ₄ -formate 1.0 M
29	-	Na-acetat (pH 4.6), 0.1 M	NH ₄ -sulfate 1.0 M
30	-	Tris/HCl (pH 8.5), 0.1 M	NH ₄ -sulfate 1.0 M
31	-	-	NH ₄ -sulfate 1.0 M
32	Na-chloride 0.1 M	HEPES (pH 7.5), 0.1 M	NH ₄ -sulfate 0.8 M
33	Co-chloride 0.01 M	MES (pH 6.5), 0.1 M	NH ₄ -sulfate 0.9 M
34	K-,Na-tartrate 0.2 M	Na-citrate (pH 5.6), 0.1 M	NH ₄ -sulfate 1.0 M
35	-	-	Imidazole (pH 7.0), 0.5 M
36	-	-	K-,Na-tartrate 0.2 M
37	-	HEPES (pH 7.5), 0.1 M	K-,Na-tartrate 0.4 M
38	-	Imidazole (pH 6.5), 0.1 M	Na-acetate 0.5 M
39	Cd-sulfate 0.05 M	HEPES (pH 7.5), 0.1 M	Na-acetate 0.5 M
40	-	Na-cacodylat (pH 6.5) 0.1 M	Na-acetate 0.7 M
41	-	Na-acetat (pH 4.6), 0.1 M	Na-chloride 1.0 M
42	Na-phosphate 0.1 M, K-phosphate 0.1 M	MES (pH 6.5), 0.1 M	Na-chloride 1.0 M
43	-	HEPES (pH 7.5), 0.1 M	Na-chloride 2.15 M
44	-	HEPES (pH 7.5), 0.1 M	Na-citrat 0.7 M
45	-	-	Na-citrat 0.8 M (pH 6.5)
46	-	HEPES (pH 7.5), 0.1 M	Na-phosphate 0.4 M, K-phosphate 0.4 M
47	-	Na-acetat (pH 4.6), 0.1 M	Na-formate 1 M
48	-	-	Na-formate 2 M
49	-	BICINE (pH 9.0), 0.1 M	Dioxane 1 %, PEG 20000 5 %
50	-	MES (pH 6.5), 0.1 M	Dioxane 5 %, NH ₄ -sulfate 0.8 M
51	-	-	Dioxane 17.5 %
52	Na-chloride 0.5 M	Na-citrate (pH 5.6), 0.1 M	Ethylene imin 1 %
53	-	Tris/HCl (pH 8.5), 0.1 M	Glycerol 6 %, NH ₄ -sulfate 0.75 M
54	Na-chloride 0.25 M, Mg-chloride 0.005 M	-	CTAB 0.01 M
55	Fe(III)-chloride 0.01 M	Na-citrate (pH 5.6), 0.1 M	Jeffamine M-600 5 %
56	-	HEPES (pH 7.5), 0.1 M	Jeffamine M-600 10 %
57	NH ₄ -sulfate 0.5 M	Na-citrate (pH 5.6), 0.1 M	Li-sulfate 0.5 M
58	Ni-chloride 0.01 M	Tris/HCl (pH 8.5), 0.1 M	Li-sulfate 0.5 M
59	-	HEPES (pH 7.5), 0.1 M	Li-sulfate 0.75 M
60	-	BICINE (pH 9.0), 0.1 M	Mg-chloride 1.0 M

61	-	-	Mg-formate 0.1 M
62	-	MES (pH 6.5), 0.1 M	Mg-sulfate 0.8 M
63	-	Tris/HCl (pH 8.5), 0.1 M	PEG 8000 4 %
64	-	HEPES (pH 7.5), 0.1 M	PEG 8000 5 %
65	Li-sulfate 0.5 M	-	PEG 8000 7.5 %
66	Zn-acetate 0.2 M	Na-cacodylat (pH 6.5), 0.1 M	PEG 8000 9 %
67	Ca-acetate 0.2 M	Na-cacodylat (pH 6.5), 0.1 M	PEG 8000 9 %
68	Mg-acetate 0.2 M	Na-cacodylat (pH 6.5), 0.1 M	PEG 8000 10 %
69	K-phosphate 0.05 M	-	PEG 8000 10 %
70	NH ₄ -sulfate 0.2 M	Na-cacodylat (pH 6.5), 0.1 M	PEG 8000 15 %
71	Na-acetate 0.2 M	Na-cacodylat (pH 6.5), 0.1 M	PEG 8000 15 %
72	NH ₄ -sulfate 0.2 M	-	PEG 8000 15 %
73	-	HEPES (pH 7.5), 0.1 M	PEG 400 1 %, NH ₄ -sulfate 1.0 M
74	Ca-chloride 0.2 M	HEPES (pH 7.5), 0.1 M	PEG 400 14 %
75	Cd-chloride 0.1 M	Na-acetat (pH 4.6), 0.1 M	PEG 400 15 %
76	Mg-chloride 0.2 M	HEPES (pH 7.5), 0.1 M	PEG 400 15 %
77	Na-citrate 0.2 M	Tris/HCl (pH 8.5), 0.1 M	PEG 400 15 %
78	Na-chloride 0.1 M	BICINE (pH 9.0), 0.1 M	PEG 550 MME 10 %
79	Zn-sulfate 0.01 M	MES (pH 6.5), 0.1 M	PEG 550 MME 12.5 %
80	-	-	PEG 1000 5 %, PEG 8000 5 %
81	-	-	PEG 1500 15 %
82	Ni-chloride 0.01 M	Tris/HCl (pH 8.5), 0.1 M	PEG 2000 MME 10 %
83	NH ₄ -sulfate 0.2 M	Na-acetat (pH 4.6), 0.1 M	PEG 2000 MME 15 %
84	-	Na-acetat (pH 4.6), 0.1 M	PEG 4000 4 %
85	NH ₄ -sulfate 0.2 M	Na-acetat (pH 4.6), 0.1 M	PEG 4000 12.5 %
86	NH ₄ -acetate 0.2 M	Na-acetat (pH 4.6), 0.1 M	PEG 4000 15 %
87	NH ₄ -acetate 0.2 M	Na-citrate (pH 5.6), 0.1 M	PEG 4000 15 %
88	Mg-chloride 0.2 M	Tris/HCl (pH 8.5), 0.1 M	PEG 4000 15 %
89	Li-sulfate 0.2 M	Tris/HCl (pH 8.5), 0.1 M	PEG 4000 15 %
90	Na-acetate 0.2 M	Tris/HCl (pH 8.5), 0.1 M	PEG 4000 15 %
91	NH ₄ -sulfate 0.2 M	-	PEG 4000 15 %
92	NH ₄ -sulfate 0.2 M	MES (pH 6.5), 0.1 M	PEG 5000 MME 15 %
93	-	HEPES (pH 7.5), 0.1 M	PEG 6000 5 %, MPD 2.5 %
94	-	-	PEG 6000 5 %, Na-chloride 1 M
95	-	HEPES (pH 7.5), 0.1 M	PEG 10000 10 %, Ethylene glycol 4 %
96	-	MES (pH 6.5), 0.1 M	PEG 20000 6 %

5.7.6 Nextal Anions

<i>Lösung</i>	<i>Puffer</i>	<i>Fällungsmittel</i>
1	Na-acetate (pH 4.6), 0.1 M	Na-acetate 2.5 M
2	Na-acetate (pH 4.6), 0.1 M	Na-acetate 1.25 M
3	Na-acetate (pH 4.6), 0.1 M	Na-citrate 1.2 M
4	Na-acetate (pH 4.6), 0.1 M	Na-citrate 0.6 M
5	Na-acetate (pH 4.6), 0.1 M	Na-fluoride 0.6 M
6	Na-acetate (pH 4.6), 0.1 M	Na-fluoride 0.3 M
7	MES (pH 6.5), 0.1 M	Na-acetate 2.5 M
8	MES (pH 6.5), 0.1 M	Na-acetate 1.25 M
9	MES (pH 6.5), 0.1 M	Na-citrate 1.2 M
10	MES (pH 6.5), 0.1 M	Na-citrate 0.6 M
11	MES (pH 6.5), 0.1 M	Na-fluoride 0.6 M
12	MES (pH 6.5), 0.1 M	Na-fluoride 0.3 M
13	HEPES (pH 7.5), 0.1 M	Na-acetate 2.5 M
14	HEPES (pH 7.5), 0.1 M	Na-acetate 1.25 M
15	HEPES (pH 7.5), 0.1 M	Na-citrate 1.2 M

16	HEPES (pH 7.5), 0.1 M	Na-citrate 0.6 M
17	HEPES (pH 7.5), 0.1 M	Na-fluoride 0.6 M
18	HEPES (pH 7.5), 0.1 M	Na-fluoride 0.3 M
19	TRIS/HCl (pH 8.5), 0.1 M	Na-acetate 2.5 M
20	TRIS/HCl (pH 8.5), 0.1 M	Na-acetate 1.25 M
21	TRIS/HCl (pH 8.5), 0.1 M	Na-citrate 1.2 M
22	TRIS/HCl (pH 8.5), 0.1 M	Na-citrate 0.6 M
23	TRIS/HCl (pH 8.5), 0.1 M	Na-fluoride 0.6 M
24	TRIS/HCl (pH 8.5), 0.1 M	Na-fluoride 0.3 M
25	Na-acetate (pH 4.6), 0.1 M	Na-formate 3.5 M
26	Na-acetate (pH 4.6), 0.1 M	Na-formate 1.75 M
27	Na-acetate (pH 4.6), 0.1 M	Na-bromide 3.5 M
28	Na-acetate (pH 4.6), 0.1 M	Na-bromide 1.75 M
29	Na-acetate (pH 4.6), 0.1 M	Na-malonate 2.4 M
30	Na-acetate (pH 4.6), 0.1 M	Na-malonate 1.2 M
31	MES (pH 6.5), 0.1 M	Na-formate 3.5 M
32	MES (pH 6.5), 0.1 M	Na-formate 1.75 M
33	MES (pH 6.5), 0.1 M	Na-bromide 3.5 M
34	MES (pH 6.5), 0.1 M	Na-bromide 1.75 M
35	MES (pH 6.5), 0.1 M	Na-malonate 2.4 M
36	MES (pH 6.5), 0.1 M	Na-malonate 1.2 M
37	HEPES (pH 7.5), 0.1 M	Na-formate 3.5 M
38	HEPES (pH 7.5), 0.1 M	Na-formate 1.75 M
39	HEPES (pH 7.5), 0.1 M	Na-bromide 3.5 M
40	HEPES (pH 7.5), 0.1 M	Na-bromide 1.75 M
41	HEPES (pH 7.5), 0.1 M	Na-malonate 2.4 M
42	HEPES (pH 7.5), 0.1 M	Na-malonate 1.2 M
43	TRIS/HCl (pH 8.5), 0.1 M	Na-formate 3.5 M
44	TRIS/HCl (pH 8.5), 0.1 M	Na-formate 1.75 M
45	TRIS/HCl (pH 8.5), 0.1 M	Na-bromide 3.5 M
46	TRIS/HCl (pH 8.5), 0.1 M	Na-bromide 1.75 M
47	TRIS/HCl (pH 8.5), 0.1 M	Na-malonate 2.4 M
48	TRIS/HCl (pH 8.5), 0.1 M	Na-malonate 1.2 M
49	Na-acetate (pH 4.6), 0.1 M	Na-nitrate 3.5 M
50	Na-acetate (pH 4.6), 0.1 M	Na-nitrate 1.75 M
51	Na-acetate (pH 4.6), 0.1 M	Na-phosphate 0.9 M, K-phosphat 0.9 M
52	Na-acetate (pH 4.6), 0.1 M	Na-phosphate 0.45 M, K-phosphat 0.45 M
53	Na-acetate (pH 4.6), 0.1 M	Na-succinate 1.0 M
54	Na-acetate (pH 4.6), 0.1 M	Na-succinate 0.5 M
55	MES (pH 6.5), 0.1 M	Na-nitrate 3.5 M
56	MES (pH 6.5), 0.1 M	Na-nitarte 1.75 M
57	MES (pH 6.5), 0.1 M	Na-phosphate 0.9 M, K-phosphat 0.9 M
58	MES (pH 6.5), 0.1 M	Na-phosphate 0.45 M, K-phosphat 0.45 M
59	MES (pH 6.5), 0.1 M	Na-succinate 1.0 M
60	MES (pH 6.5), 0.1 M	Na-succinate 0.5 M
61	HEPES (pH 7.5) 0.1 M	Na-nitrate 3.5 M
62	HEPES (pH 7.5) 0.1 M	Na-nitarte 1.75 M
63	HEPES (pH 7.5) 0.1 M	Na-phosphate 0.9 M, K-phosphat 0.9 M
64	HEPES (pH 7.5) 0.1 M	Na-phosphate 0.45 M, K-phosphat 0.45 M
65	HEPES (pH 7.5) 0.1 M	Na-succinate 1.0 M
66	HEPES (pH 7.5) 0.1 M	Na-succinate 0.5 M
67	TRIS/HCl (pH 8.5), 0.1 M	Na-nitrate 3.5 M
68	TRIS/HCl (pH 8.5), 0.1 M	Na-nitarte 1.75 M
69	TRIS/HCl (pH 8.5), 0.1 M	Na-phosphate 0.9 M, K-phosphat 0.9 M
70	TRIS/HCl (pH 8.5), 0.1 M	Na-phosphate 0.45 M, K-phosphat 0.45 M

71	TRIS/HCl (pH 8.5), 0.1 M	Na-succinate 1.0 M
72	TRIS/HCl (pH 8.5), 0.1 M	Na-succinate 0.5 M
73	Na-acetate (pH 4.6), 0.1 M	Na-sulfate 0.75 M
74	Na-acetate (pH 4.6), 0.1 M	Na-sulfate 0.37 M
75	Na-tartrate (pH 5.6), 0.1 M	K-,N-tartrate 1.2 M
76	Na-tartrate (pH 5.6), 0.1 M	K-,N-tartrate 0.6 M
77	Na-acetate (pH 4.6), 0.1 M	Na-thiocyanate 2.4 M
78	Na-acetate (pH 4.6), 0.1 M	Na-thiocyanate 1.2 M
79	MES (pH 6.5), 0.1 M	Na-sulfate 0.75 M
80	MES (pH 6.5), 0.1 M	Na-sulfate 0.37 M
81	MES (pH 6.5), 0.1 M	K-,N-tartrate 1.2 M
82	MES (pH 6.5), 0.1 M	K-,N-tartrate 0.6 M
83	MES (pH 6.5), 0.1 M	Na-thiocyanate 2.4 M
84	MES (pH 6.5), 0.1 M	Na-thiocyanate 1.2 M
85	HEPES (pH 7.5) 0.1 M	Na-sulfate 0.75 M
86	HEPES (pH 7.5) 0.1 M	Na-sulfate 0.37 M
87	HEPES (pH 7.5) 0.1 M	K-,N-tartrate 1.2 M
88	HEPES (pH 7.5) 0.1 M	K-,N-tartrate 0.6 M
89	HEPES (pH 7.5) 0.1 M	Na-thiocyanate 2.4 M
90	HEPES (pH 7.5) 0.1 M	Na-thiocyanate 1.2 M
91	TRIS/HCl (pH 8.5), 0.1 M	Na-sulfate 0.75 M
92	TRIS/HCl (pH 8.5), 0.1 M	Na-sulfate 0.37 M
93	TRIS/HCl (pH 8.5), 0.1 M	K-,N-tartrate 1.2 M
94	TRIS/HCl (pH 8.5), 0.1 M	K-,N-tartrate 0.6 M
95	TRIS/HCl (pH 8.5), 0.1 M	Na-thiocyanate 2.4 M
96	TRIS/HCl (pH 8.5), 0.1 M	Na-thiocyanate 1.2 M

Bezeichnung	Protein	Proteinkonzentration	Methode	Reservoirvolumen	Tropfengröße	Kristallisationsbedingung	Beobachtung	Kryopuffer
Tthdode BM1a6a	<i>T. th.</i> Dodecin nicht-rekonstituiert	7 mg/mL mit 5 % Glycerin	7 mg/mL mit 5 % Glycerin	1 mL	1 µL + 1 µL	0.2 M Mg(OAc) ₂ , 0.1 M Natriumcacodylat 30 % MPD	Tetragonale 150 µm Kristalle nach mehreren Wochen aus Präzipitat heraus	
Tthdode BM27a3a	<i>T. th</i> Dodecin FMN-rekonstituiert	5 mg/mL mit 5 % Glycerin	Hanging drop	750 µL	1 µL + 1 µL	0.2 M NaCitrat 0.1 M Tris/HCl, pH 7.5 25 % PEG 400	Tieforange Kristalle nach 2 Wochen	0.2 M NaCitrat 0.1 M Tris/HCl, pH 7.5 30 % PEG 400
Tthdode R45A BM53c1	<i>T. th</i> Dodecin R45A-Mutante FMN-rekonstituiert	7.5 mg/mL	Hanging drop	1 mL	1 µL + 1 µL	0.1 M Ammoniumsulfat 0.05 M Cacodylat, pH 6.5 15 % PEG 8000	0.5 mm Kristalle nach 1 Woche aus Präzipitat heraus	0.1 M Ammoniumsulfat 0.05 M Cacodylat, pH 6.5 15 % PEG 8000 20 % Glycerin
Tthdode W38Y BM22d1	<i>T. th</i> Dodecin W38Y-Mutante nicht-rekonstituiert	4.5 mg/mL	Hanging drop	750 µL	1 µL + 1 µL	0.05 M HEPES, pH 7.5 5 % Isopropanol 10 % PEG 4000	Schwach gefärbte 0.4 mm Säulen nach 2 Monaten	0.05 M HEPES, pH 7.5 8.5 % Isopropanol 17 % PEG 4000 20 % Glycerin
Tthdode W38F BM31a2	<i>T. th</i> Dodecin W38F-Mutante nicht-rekonstituiert	7.3 mg/mL	Hanging drop	1 mL	1 µL + 1 µL	0.05 M HEPES, pH 7.0 2.5 % Isopropanol 10 % PEG 4000	Leicht gefärbte Säulen nach 1 Woche	0.05 M HEPES, pH 7.0 8.5 % Isopropanol 17 % PEG 4000 20% Glycerin
Tthdode W38F BM222	<i>T. th</i> Dodecin W38F-Mutante FMN-rekonstituiert kokristallisiert mit CoA	25 mg/mL 2 eq CoA	Hanging drop	1 mL	1 µL + 1 µL	0.2 M ammonium acetate, 0.1 M sodium citrate, pH 5.2, 22.5 % MPD	300 µm Säulen nach wenigen Tagen	0.2 M ammonium acetate, 0.1 M sodium citrate, pH 5.2, 30 % MPD
TthdodeR65A BM11/r65anca4	<i>T. th</i> Dodecin R65A-Mutante FMN-rekonstituiert	26 mg/mL	Sitting drop	100 µL	300 nL+300nL	0.4 M (NH ₄) ₂ PO ₄	Hexagonale 0.2 mm Kristalle nach 1 Monat	0.4 M (NH ₄) ₂ PO ₄ 35 % Glycerin
TthdodeR65A BM13	<i>T. th</i> Dodecin R65A-Mutante nicht-rekonstituiert	42 mg/mL	Sitting drop	100 µL	300 nL+300nL	0.4 M (NH ₄) ₂ PO ₄	Hexagonale 0.3 mm Kristalle nach 3 Monaten	0.4 M (NH ₄) ₂ PO ₄ 35 % Glycerin

Bezeichnung	Protein	Proteinkonzentration	Methode	Reservoirvolumen	Tropfengröße	Kristallisationsbedingung	Beobachtung	Krypuffer
BM102	<i>M.t Dodecin</i> FMN-rekonstituiert kokristallisiert mit CoA	9 mg/mL 2 eq CoA	Hanging drop	1 mL	1 µL + 1 µL	0.01 M CoCl ₂ 0.1 M NaOAc, pH 5 0.2 M Hexandiol	Optisch schöne Kristalle nach wenigen Tagen	0.01 M CoCl ₂ 0.1 M NaOAc, pH5 0.6 M Hexandiol 20 % Glycerin
BM212	<i>M.t Dodecin</i> FMN-rekonstituiert kokristallisiert mit CoA	9 mg/mL 2 eq CoA	Hanging drop	1 mL	1 µL + 1 µL	0.1 M NaOAc, pH 5 0.2 M NaF	Optisch schöne Kristalle nach wenigen Tagen	0.1 M NaOAc, pH 5 0.2M NaF 20 % Glycerin
BM209	<i>M.t Dodecin</i> FMN-rekonstituiert kokristallisiert mit CoA	9 mg/mL 2 eq CoA	Hanging drop	1 mL	1 µL + 1 µL	. 0.01M CaCl ₂ 0.1 M NaOAc, pH 5 12.5 % MPD	Optisch schöne Kristalle nach wenigen Tagen	0.01M CaCl ₂ 0.1 M NaOAc, pH 5 27 % MPD

5.9 Aminosäurezusammensetzung der Dodecine

In folgender Abbildung sind die Aminosäurezusammensetzungen der Dodecine aus *T. thermophilus*, *M. tuberculosis*, *S. coelicolor*, *H. halophila* und *H. salinarum* graphisch dargestellt.

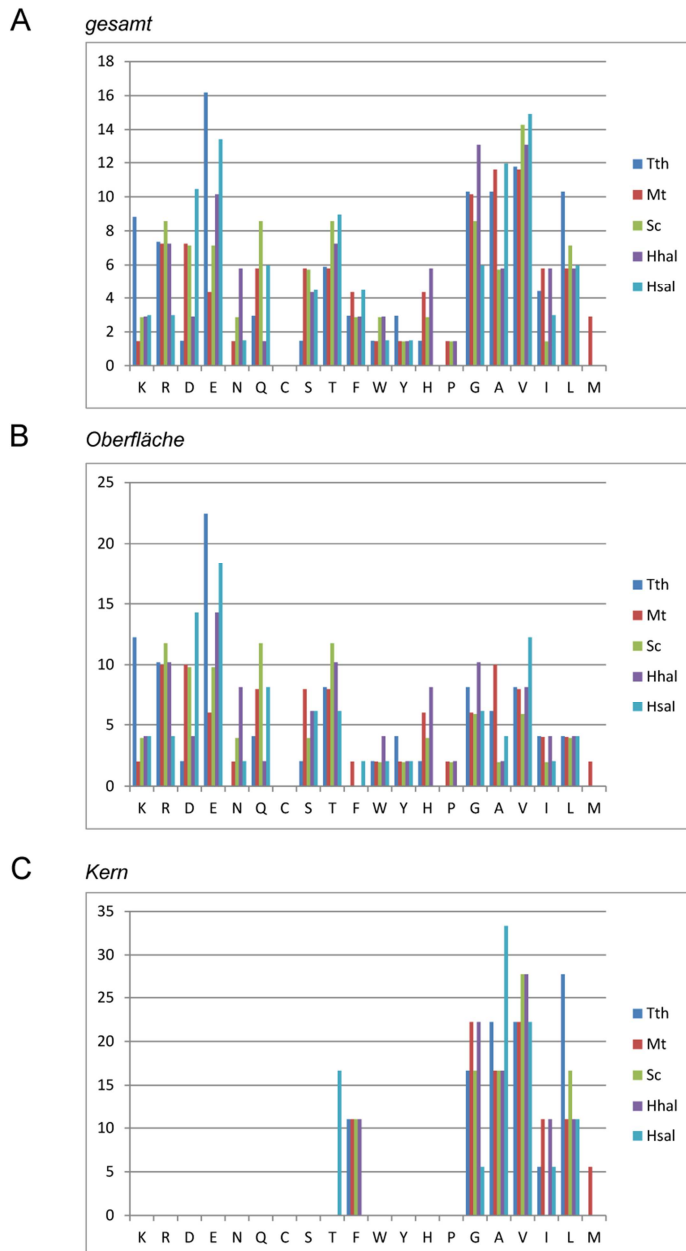


Abb: Aminosäurezusammensetzung der Dodecine aus *T. thermophilus*, *M. tuberculosis*, *S. coelicolor*, *H. halophila* und *H. salinarum*.

A: Zusammensetzung gesamt in Prozent

B: Zusammensetzung an der Oberfläche in Prozent (100 % entspricht alle Reste auf der Oberfläche).

C: Zusammensetzung im Kern in Prozent (100 % entspricht alle Reste im Kern).

6 Literatur

1. Joosten, V. and van Berkel, W.J., *Flavoenzymes*. Curr Opin Chem Biol, 2007. **11**(2): p. 195-202.
2. Abbas, C.A. and Sibirny, A.A., *Genetic control of biosynthesis and transport of riboflavin and flavin nucleotides and construction of robust biotechnological producers*. Microbiol Mol Biol Rev, 2011. **75**(2): p. 321-60.
3. Massey, V., *The chemical and biological versatility of riboflavin*. Biochem Soc Trans, 2000. **28**(4): p. 283-96.
4. Cardoso, D.R., Libardi, S.H., and Skibsted, L.H., *Riboflavin as a photosensitizer. Effects on human health and food quality*. Food Funct, 2012. **3**(5): p. 487-502.
5. Wahl, P., Auchet, J.C., Visser, A.J., and Muller, F., *Time resolved fluorescence of flavin adenine dinucleotide*. FEBS Lett, 1974. **44**(1): p. 67-70.
6. Naman, S.A., Tegner, L., *Decay kinetics of the triplet excited state of lumiflavin*. Photochem Photobiol, 1986. **43**: p. 331-333.
7. Lakowicz, J.R., *Principles of fluorescence*, ed. Auflage. Vol. 3. Auflage. 2006: Springer.
8. Huvaere, K., Olsen, K., and Skibsted, L.H., *Quenching of triplet-excited flavins by flavonoids. Structural assessment of antioxidative activity*. J Org Chem, 2009. **74**(19): p. 7283-93.
9. Benzie, I.F., *Evolution of dietary antioxidants*. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol, 2003. **136**(1): p. 113-26.
10. Sheraz, M.A., Kazi, S.H., Ahmed, S., Anwar, Z., and Ahmad, I., *Photo, thermal and chemical degradation of riboflavin*. Beilstein J Org Chem, 2014. **10**: p. 1999-2012.
11. De Colibus, L. and Mattevi, A., *New frontiers in structural flavoenzymology*. Curr Opin Struct Biol, 2006. **16**(6): p. 722-8.
12. Fraaije, M.W. and Mattevi, A., *Flavoenzymes: diverse catalysts with recurrent features*. Trends Biochem Sci, 2000. **25**(3): p. 126-32.
13. Macheroux, P., Kappes, B., and Ealick, S.E., *Flavogenomics-a genomic and structural view of flavin-dependent proteins*. FEBS J, 2011. **278**(15): p. 2625-34.
14. Mewies, M., McIntire, W.S., and Scrutton, N.S., *Covalent attachment of flavin adenine dinucleotide (FAD) and flavin mononucleotide (FMN) to enzymes: the current state of affairs*. Protein Sci, 1998. **7**(1): p. 7-20.
15. Walsh, C., *Flavin Coenzymes: At the Crossroad of Biological Redox Chemistry*. Acc, Chem. Res., 1980. **13**: p. 148-155.
16. Ghisla, S.M., V., *Mechanism of flavoprotein-catalyzed reactions*. Eur J Biochem, 1989. **181**: p. 1-17.
17. Niemz, A. and Rotello, V.M., *Model systems for flavoenzyme activity. The effects of specific hydrogen bonds on the ¹³C and ¹H NMR of flavins*. J Mol Recognit, 1996. **9**(2): p. 158-62.
18. Barman, B.G. and Tollin, G., *Flavine-protein interactions in flavoenzymes. Thermodynamics and kinetics of reduction of Azotobacter flavodoxin*. Biochemistry, 1972. **11**(25): p. 4755-9.
19. Gomez-Moreno, C., Choy, M., and Edmondson, D.E., *Purification and properties of the bacterial flavoprotein: thiamin dehydrogenase*. J Biol Chem, 1979. **254**(16): p. 7630-5.
20. Mayhew, S.G. and Tollin, G., *General properties of flavodoxins*, in *Chemistry and Biology of Flavoproteins*, F. Müller, Editor. 1992, CRC Press, Boca Raton FL. p. 389-426.

21. Ludwig, M.K. and Luschinsky, C.L., *Structure and redox properties of Clostridial flavodoxin*, in *Chemistry and Biochemistry of Flavoenzymes*, F. Müller, Editor. 1992, CRC Press, Boca Raton, FL.
22. Sancho, J., *Flavodoxins: sequence, folding, binding, function and beyond*. Cell Mol Life Sci, 2006. **63**(7-8): p. 855-64.
23. Thorneley, R.N. and Deistung, J., *Electron-transfer studies involving flavodoxin and a natural redox partner, the iron protein of nitrogenase. Conformational constraints on protein-protein interactions and the kinetics of electron transfer within the protein complex*. Biochem J, 1988. **253**(2): p. 587-95.
24. Nieva-Gomez, D., Roberts, G.P., Klevickis, S., and Brill, W.J., *Electron transport to nitrogenase in Klebsiella pneumoniae*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1980. **77**(5): p. 2555-8.
25. Rao, S.T., Shaffie, F., Yu, C., Satyshur, K.A., Stockman, B.J., Markley, J.L., and Sundarlingam, M., *Structure of the oxidized long-chain flavodoxin from Anabaena 7120 at 2 Angström resolution*. Protein Sci, 1992. **1**(11): p. 1413-27.
26. Watt, W., Tulinsky, A., Swenson, R.P., and Watenpaugh, K.D., *Comparison of the crystal structures of a flavodoxin in its three oxidation states at cryogenic temperatures*. J Mol Biol, 1991. **218**(1): p. 195-208.
27. Watenpaugh, K.D., Sieker, L.C., and Jensen, L.H., *The binding of riboflavin-5'-phosphate in a flavoprotein: flavodoxin at 2.0-Angstrom resolution*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1973. **70**(12): p. 3857-60.
28. Swenson, R.P. and Krey, G.D., *Site-directed mutagenesis of tyrosine-98 in the flavodoxin from Desulfovibrio vulgaris (Hildenborough): regulation of oxidation-reduction properties of the bound FMN cofactor by aromatic, solvent, and electrostatic interactions*. Biochemistry, 1994. **33**(28): p. 8505-14.
29. Zhou, Z. and Swenson, R.P., *The cumulative electrostatic effect of aromatic stacking interactions and the negative electrostatic environment of the flavin mononucleotide binding site is a major determinant of the reduction potential for the flavodoxin from Desulfovibrio vulgaris [Hildenborough]*. Biochemistry, 1996. **35**(50): p. 15980-8.
30. Muralidhara, B.K. and Wittung-Stafshede, P., *Thermal unfolding of Apo and Holo Desulfovibrio desulfuricans flavodoxin: cofactor stabilizes folded and intermediate states*. Biochemistry, 2004. **43**(40): p. 12855-64.
31. Lopez-Llano, J., Maldonado, S., Bueno, M., Lostao, A., Angeles-Jimenez, M., Lillo, M.P., and Sancho, J., *The long and short flavodoxins: I. The role of the differentiating loop in apoflavodoxin structure and FMN binding*. J Biol Chem, 2004. **279**(45): p. 47177-83.
32. Lopez-Llano, J., Maldonado, S., Jain, S., Lostao, A., Godoy-Ruiz, R., Sanchez-Ruiz, J.M., Cortijo, M., Fernandez-Recio, J., and Sancho, J., *The long and short flavodoxins: II. The role of the differentiating loop in apoflavodoxin stability and folding mechanism*. J Biol Chem, 2004. **279**(45): p. 47184-91.
33. Conrad, K.S., Manahan, C.C., and Crane, B.R., *Photochemistry of flavoprotein light sensors*. Nat Chem Biol, 2014. **10**(10): p. 801-9.
34. Salomon, M., Christie, J.M., Knieb, E., Lempert, U., and Briggs, W.R., *Photochemical and mutational analysis of the FMN-binding domains of the plant blue light receptor, phototropin*. Biochemistry, 2000. **39**(31): p. 9401-10.
35. Herrou, J. and Crosson, S., *Function, structure and mechanism of bacterial photosensory LOV proteins*. Nat Rev Microbiol, 2011. **9**(10): p. 713-23.
36. Briggs, W.R., *The LOV domain: a chromophore module servicing multiple photoreceptors*. J Biomed Sci, 2007. **14**(4): p. 499-504.
37. Akbar, S., Gaidenko, T.A., Kang, C.M., O'Reilly, M., Devine, K.M., and Price, C.W., *New family of regulators in the environmental signaling pathway which activates the*

- general stress transcription factor sigma(B) of Bacillus subtilis*. J Bacteriol, 2001. **183**(4): p. 1329-38.
38. Avila-Perez, M., Hellingwerf, K.J., and Kort, R., *Blue light activates the sigmaB-dependent stress response of Bacillus subtilis via YtvA*. J Bacteriol, 2006. **188**(17): p. 6411-4.
 39. Purcell, E.B., Siegal-Gaskins, D., Rawling, D.C., Fiebig, A., and Crosson, S., *A photosensory two-component system regulates bacterial cell attachment*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(46): p. 18241-6.
 40. Swartz, T.E., Tseng, T.S., Frederickson, M.A., Paris, G., Comerchi, D.J., Rajashekara, G., Kim, J.G., Mudgett, M.B., Splitter, G.A., Ugalde, R.A., Goldbaum, F.A., Briggs, W.R., and Bogomolni, R.A., *Blue-light-activated histidine kinases: two-component sensors in bacteria*. Science, 2007. **317**(5841): p. 1090-3.
 41. Masuda, S., *Light detection and signal transduction in the BLUF photoreceptors*. Plant Cell Physiol, 2013. **54**(2): p. 171-9.
 42. Gomelsky, M. and Hoff, W.D., *Light helps bacteria make important lifestyle decisions*. Trends Microbiol, 2011. **19**(9): p. 441-8.
 43. Chaves, I., Pokorny, R., Byrdin, M., Hoang, N., Ritz, T., Brettel, K., Essen, L.O., van der Horst, G.T., Batschauer, A., and Ahmad, M., *The cryptochromes: blue light photoreceptors in plants and animals*. Annu Rev Plant Biol, 2011. **62**: p. 335-64.
 44. Sancar, A., *Structure and function of DNA photolyase and cryptochrome blue-light photoreceptors*. Chem Rev, 2003. **103**(6): p. 2203-37.
 45. Essen, L.O. and Klar, T., *Light-driven DNA repair by photolyases*. Cell Mol Life Sci, 2006. **63**(11): p. 1266-77.
 46. Fraikin, G.Y., Strakhovskaya, M.G., and Rubin, A.B., *Biological photoreceptors of light-dependent regulatory processes*. Biochemistry (Mosc), 2013. **78**(11): p. 1238-53.
 47. Monaco, H.L., *Crystal structure of chicken riboflavin-binding protein*. EMBO J, 1997. **16**(7): p. 1475-83.
 48. White, H.B., 3rd and Merrill, A.H., Jr., *Riboflavin-binding proteins*. Annu Rev Nutr, 1988. **8**: p. 279-99.
 49. Adiga, P.R., Subramanian, S., Rao, J., and Kumar, M., *Prospects of riboflavin carrier protein (RCP) as an antifertility vaccine in male and female mammals*. Hum Reprod Update, 1997. **3**(4): p. 325-34.
 50. Barnham, K.J., McKinstry, W.J., Multhaup, G., Galatis, D., Morton, C.J., Curtain, C.C., Williamson, N.A., White, A.R., Hinds, M.G., Norton, R.S., Beyreuther, K., Masters, C.L., Parker, M.W., and Cappai, R., *Structure of the Alzheimer's disease amyloid precursor protein copper binding domain. A regulator of neuronal copper homeostasis*. J Biol Chem, 2003. **278**(19): p. 17401-7.
 51. Blankenhorn, G., *Riboflavin binding in egg-white flavoprotein: the role of tryptophan and tyrosine*. Eur J Biochem, 1978. **82**(1): p. 155-60.
 52. Miller, S.G. and Silhacek, D.L., *Riboflavin binding proteins and flavin assimilation in insects*. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol, 1995. **110**(3): p. 467-75.
 53. Leonardi, R., Zhang, Y.M., Rock, C.O., and Jackowski, S., *Coenzyme A: back in action*. Prog Lipid Res, 2005. **44**(2-3): p. 125-53.
 54. Baddiley, J., Thain, E.M., Novelli, G.D., and Lipmann, F., *Structure of coenzyme A*. Nature, 1953. **171**(4341): p. 76.
 55. Engel, C. and Wierenga, R., *The diverse world of coenzyme A binding proteins*. Curr Opin Struct Biol, 1996. **6**(6): p. 790-7.
 56. Engel, C.K., Mathieu, M., Zeelen, J.P., Hiltunen, J.K., and Wierenga, R.K., *Crystal structure of enoyl-coenzyme A (CoA) hydratase at 2.5 angstroms resolution: a spiral fold defines the CoA-binding pocket*. EMBO J, 1996. **15**(19): p. 5135-45.

57. Remington, S., Wiegand, G., and Huber, R., *Crystallographic refinement and atomic models of two different forms of citrate synthase at 2.7 and 1.7 Angström resolution*. J Mol Biol, 1982. **158**(1): p. 111-52.
58. Kragelund, B.B., Andersen, K.V., Madsen, J.C., Knudsen, J., and Poulsen, F.M., *Three-dimensional structure of the complex between acyl-coenzyme A binding protein and palmitoyl-coenzyme A*. J Mol Biol, 1993. **230**(4): p. 1260-77.
59. Lawrence, C.M., Rodwell, V.W., and Stauffacher, C.V., *Crystal structure of Pseudomonas mevalonii HMG-CoA reductase at 3.0 angstrom resolution*. Science, 1995. **268**(5218): p. 1758-62.
60. Pereira-Leal, J.B., Levy, E.D., and Teichmann, S.A., *The origins and evolution of functional modules: lessons from protein complexes*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2006. **361**(1467): p. 507-17.
61. Goodsell, D.S. and Olson, A.J., *Structural symmetry and protein function*. Annu Rev Biophys Biomol Struct, 2000. **29**: p. 105-53.
62. Marianayagam, N.J., Sunde, M., and Matthews, J.M., *The power of two: protein dimerization in biology*. Trends Biochem Sci, 2004. **29**(11): p. 618-25.
63. Blundell, T.L. and Srinivasan, N., *Symmetry, stability, and dynamics of multidomain and multicomponent protein systems*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(25): p. 14243-8.
64. Lander, G.C., Tang, L., Casjens, S.R., Gilcrease, E.B., Prevelige, P., Poliakov, A., Potter, C.S., Carragher, B., and Johnson, J.E., *The structure of an infectious P22 virion shows the signal for headful DNA packaging*. Science, 2006. **312**(5781): p. 1791-5.
65. Olia, A.S., Prevelige, P.E., Jr., Johnson, J.E., and Cingolani, G., *Three-dimensional structure of a viral genome-delivery portal vertex*. Nat Struct Mol Biol, 2011. **18**(5): p. 597-603.
66. Bruey, J.M., Ducasse, C., Bonniaud, P., Ravagnan, L., Susin, S.A., Diaz-Latoud, C., Gurbuxani, S., Arrigo, A.P., Kroemer, G., Solary, E., and Garrido, C., *Hsp27 negatively regulates cell death by interacting with cytochrome c*. Nat Cell Biol, 2000. **2**(9): p. 645-52.
67. Lee, G.J., Roseman, A.M., Saibil, H.R., and Vierling, E., *A small heat shock protein stably binds heat-denatured model substrates and can maintain a substrate in a folding-competent state*. EMBO J, 1997. **16**(3): p. 659-71.
68. Kim, K.K., Kim, R., and Kim, S.H., *Crystal structure of a small heat-shock protein*. Nature, 1998. **394**(6693): p. 595-9.
69. van Montfort, R.L., Basha, E., Friedrich, K.L., Slingsby, C., and Vierling, E., *Crystal structure and assembly of a eukaryotic small heat shock protein*. Nat Struct Biol, 2001. **8**(12): p. 1025-30.
70. van Rooyen, J.M., Abratt, V.R., Belrhali, H., and Sewell, T., *Crystal structure of Type III glutamine synthetase: surprising reversal of the inter-ring interface*. Structure, 2011. **19**(4): p. 471-83.
71. Guedez, G., Hipp, K., Windeisen, V., Derrer, B., Gengenbacher, M., Bottcher, B., Sinning, I., Kappes, B., and Tews, I., *Assembly of the eukaryotic PLP-synthase complex from Plasmodium and activation of the Pdx1 enzyme*. Structure, 2012. **20**(1): p. 172-84.
72. Chao, L.H., Stratton, M.M., Lee, I.H., Rosenberg, O.S., Levitz, J., Mandell, D.J., Kortemme, T., Groves, J.T., Schulman, H., and Kuriyan, J., *A mechanism for tunable autoinhibition in the structure of a human Ca²⁺/calmodulin- dependent kinase II holoenzyme*. Cell, 2011. **146**(5): p. 732-45.
73. Grant, R.A., Filman, D.J., Finkel, S.E., Kolter, R., and Hogle, J.M., *The crystal structure of Dps, a ferritin homolog that binds and protects DNA*. Nat Struct Biol, 1998. **5**(4): p. 294-303.

74. Ilari, A., Stefanini, S., Chiancone, E., and Tsernoglou, D., *The dodecameric ferritin from Listeria innocua contains a novel intersubunit iron-binding site*. Nat Struct Biol, 2000. **7**(1): p. 38-43.
75. Zeth, K., Offermann, S., Essen, L.O., and Oesterhelt, D., *Iron-oxo clusters biomineralizing on protein surfaces: structural analysis of Halobacterium salinarum DpsA in its low- and high-iron states*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(38): p. 13780-5.
76. Price, N.C., Boam, D.J., Kelly, S.M., Duncan, D., Krell, T., Gourley, D.G., Coggins, J.R., Virden, R., and Hawkins, A.R., *The folding and assembly of the dodecameric type II dehydroquinases*. Biochem J, 1999. **338** (Pt 1): p. 195-202.
77. Isupov, M.N., Dalby, A.R., Brindley, A.A., Izumi, Y., Tanabe, T., Murshudov, G.N., and Littlechild, J.A., *Crystal structure of dodecameric vanadium-dependent bromoperoxidase from the red algae Corallina officinalis*. J Mol Biol, 2000. **299**(4): p. 1035-49.
78. Villeret, V., Clantin, B., Tricot, C., Legrain, C., Roovers, M., Stalon, V., Glansdorff, N., and Van Beeumen, J., *The crystal structure of Pyrococcus furiosus ornithine carbamoyltransferase reveals a key role for oligomerization in enzyme stability at extremely high temperatures*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(6): p. 2801-6.
79. Villeret, V., Tricot, C., Stalon, V., and Dideberg, O., *Crystal structure of Pseudomonas aeruginosa catabolic ornithine transcarbamoylase at 3.0-Angström resolution: a different oligomeric organization in the transcarbamoylase family*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(23): p. 10762-6.
80. Gallego, P., Planell, R., Benach, J., Querol, E., Perez-Pons, J.A., and Reverter, D., *Structural characterization of the enzymes composing the arginine deiminase pathway in Mycoplasma penetrans*. PLoS One, 2012. **7**(10): p. e47886.
81. Kopec, J., Schnell, R., and Schneider, G., *Structure of PA4019, a putative aromatic acid decarboxylase from Pseudomonas aeruginosa*. Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun, 2011. **67**(Pt 10): p. 1184-8.
82. Rangarajan, E.S., Li, Y., Iannuzzi, P., Tocilj, A., Hung, L.W., Matte, A., and Cygler, M., *Crystal structure of a dodecameric FMN-dependent UbiX-like decarboxylase (Pad1) from Escherichia coli O157: H7*. Protein Sci, 2004. **13**(11): p. 3006-16.
83. Blaesse, M., Kupke, T., Huber, R., and Steinbacher, S., *Crystal structure of the peptidyl-cysteine decarboxylase EpiD complexed with a pentapeptide substrate*. EMBO J, 2000. **19**(23): p. 6299-310.
84. Russo, S. and Baumann, U., *Crystal structure of a dodecameric tetrahedral-shaped aminopeptidase*. J Biol Chem, 2004. **279**(49): p. 51275-81.
85. Franzetti, B., Schoehn, G., Hernandez, J.F., Jaquinod, M., Ruigrok, R.W., and Zaccai, G., *Tetrahedral aminopeptidase: a novel large protease complex from archaea*. EMBO J, 2002. **21**(9): p. 2132-8.
86. Yokoyama, H. and Fujii, S., *Structures and Metal-Binding Properties of Helicobacter pylori Neutrophil-Activating Protein with a Di-Nuclear Ferroxidase Center*. Biomolecules, 2014. **4**(3): p. 600-15.
87. Carrondo, M.A., *Ferritins, iron uptake and storage from the bacterioferritin viewpoint*. EMBO J, 2003. **22**(9): p. 1959-68.
88. Albert, A., Martinez-Ripoll, M., Espinosa-Ruiz, A., Yenush, L., Culianez-Macia, F.A., and Serrano, R., *The X-ray structure of the FMN-binding protein AtHal3 provides the structural basis for the activity of a regulatory subunit involved in signal transduction*. Structure, 2000. **8**(9): p. 961-9.
89. Kupke, T., Uebele, M., Schmid, D., Jung, G., Blaesse, M., and Steinbacher, S., *Molecular characterization of lantibiotic-synthesizing enzyme EpiD reveals a function*

- for bacterial Dfp proteins in coenzyme A biosynthesis. *J Biol Chem*, 2000. **275**(41): p. 31838-46.
90. Winter, J.M. and Moore, B.S., *Exploring the chemistry and biology of vanadium-dependent haloperoxidases*. *J Biol Chem*, 2009. **284**(28): p. 18577-81.
 91. Sheffield, D.J., Smith, A.J., Harry, T.R., and Rogers, L.J., *Thermostability of the vanadium bromoperoxidase from *Corallina officinalis**. *Biochem Soc Trans*, 1993. **21**(4): p. 445S.
 92. Weyand, M., Hecht, H., Kiess, M., Liaud, M., Vilter, H., and Schomburg, D., *X-ray structure determination of a vanadium-dependent haloperoxidase from *Ascophyllum nodosum* at 2.0 Angström resolution*. *J Mol Biol*, 1999. **293**(3): p. 595-611.
 93. Light, S.H., Krishna, S.N., Bergan, R.C., Lavie, A., and Anderson, W.F., *Crystal structure of a type II dehydroquinase dehydratase-like protein from *Bifidobacterium longum**. *J Struct Funct Genomics*, 2013. **14**(1): p. 25-30.
 94. Bieger, B., Essen, L.O., and Oesterhelt, D., *Crystal structure of halophilic dodecin: A novel, dodecameric flavin binding protein from *Halobacterium salinarum**. *Structure*, 2003. **11**(4): p. 375-385.
 95. Bogdan, C., Rollinghoff, M., and Diefenbach, A., *Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity*. *Curr Opin Immunol*, 2000. **12**(1): p. 64-76.
 96. Grninger, M., Staudt, H., Johansson, P., Wachtveitl, J., and Oesterhelt, D., *Dodecin is the key player in flavin homeostasis of archaea*. *J Biol Chem*, 2009. **284**(19): p. 13068-76.
 97. Rosenberg, A.H., Lade, B.N., Chui, D.S., Lin, S.W., Dunn, J.J., and Studier, F.W., *Vectors for selective expression of cloned DNAs by T7 RNA polymerase*. *Gene*, 1987. **56**(1): p. 125-35.
 98. Studier, F.W. and Moffatt, B.A., *Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes*. *J Mol Biol*, 1986. **189**(1): p. 113-30.
 99. Studier, F.W., Rosenberg, A.H., Dunn, J.J., and Dubendorff, J.W., *Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes*. *Methods Enzymol*, 1990. **185**: p. 60-89.
 100. Hoang, T.T., Karkhoff-Schweizer, R.R., Kutchma, A.J., and Schweizer, H.P., *A broad-host-range Flp-FRT recombination system for site-specific excision of chromosomally-located DNA sequences: application for isolation of unmarked *Pseudomonas aeruginosa* mutants*. *Gene*, 1998. **212**(1): p. 77-86.
 101. Pelicic, V., Reyrat, J.M., and Gicquel, B., *Expression of the *Bacillus subtilis* sacB gene confers sucrose sensitivity on mycobacteria*. *J Bacteriol*, 1996. **178**(4): p. 1197-9.
 102. Hanahan, D., *Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids*. *J Mol Biol*, 1983. **166**(4): p. 557-80.
 103. Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. 1989: Cold Spring Harbour Laboratory Press.
 104. Mullis, K.B. and Faloona, F.A., *Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction*. *Methods Enzymol*, 1987. **155**: p. 335-50.
 105. Vogelstein, B., Gillespie, D., *Preparative and analytical purification of DNA from agarose*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1979. **76**: p. 615-619.
 106. Dagert, M. and Ehrlich, S.D., *Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cells*. *Gene*, 1979. **6**(1): p. 23-8.
 107. Chang, D.C., Chase, B.M., Saunders, J.A., *Guide to electroporation and electrofusion*. New York, Academic Press, 1991.
 108. Ausbeul, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., *Current protocols in molecular biology*. New York, John Wiley and Sons, 1995.

109. Nelson, M. and McClelland, M., *Use of DNA methyltransferase/endonuclease enzyme combinations for megabase mapping of chromosomes*. Methods Enzymol, 1992. **216**: p. 279-303.
110. Birnboim, H.C., Doly, J., *A rapid alkaline lysis procedure for screening recombinant plasmid DNA*. Nucl. Acids. Res., 1979. **7**: p. 1523-1522.
111. Southern, E.M., *Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis*. J Mol Biol, 1975. **98**(3): p. 503-17.
112. Trunk, K., *Definition des regulatorischen Netzwerks von Pseudomonas aeruginosa zur Anpassung an anaerobe Lebensbedingungen*, in *Fachbereich für Biowissenschaften und Psychologie*. 2005, TU Braunschweig: Braunschweig.
113. Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R., *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1977. **74**(12): p. 5463-7.
114. Rahme, L.G., Tan, M.W., Le, L., Wong, S.M., Tompkins, R.G., Calderwood, S.B., and Ausubel, F.M., *Use of model plant hosts to identify Pseudomonas aeruginosa virulence factors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(24): p. 13245-50.
115. Grossman, T.H., Kawasaki, E.S., Punreddy, S.R., and Osburne, M.S., *Spontaneous cAMP-dependent derepression of gene expression in stationary phase plays a role in recombinant expression instability*. Gene, 1998. **209**(1-2): p. 95-103.
116. Hefti, M.H., Vervoort, J., and van Berkel, W.J., *Deflavination and reconstitution of flavoproteins*. Eur J Biochem, 2003. **270**(21): p. 4227-42.
117. Mayhew, S.G., *Studies on flavin binding in flavodoxins*. Biochim Biophys Acta, 1971. **235**(2): p. 289-302.
118. Haines, D.C., Sevrioukova, I.F., and Peterson, J.A., *The FMN-binding domain of cytochrome P450BM-3: resolution, reconstitution, and flavin analogue substitution*. Biochemistry, 2000. **39**(31): p. 9419-29.
119. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
120. Bennett, J. and Scott, K.J., *Quantitative staining of fraction I protein in polyacrylamide gels using Coomassie brilliant blue*. Anal Biochem, 1971. **43**(1): p. 173-82.
121. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.
122. Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., and Klenk, D.C., *Measurement of protein using bicinchoninic acid*. Anal Biochem, 1985. **150**(1): p. 76-85.
123. Koziol, J., *Fluorometric analysis of riboflavin and its coenzymes*. Methods Enzymol., 1971. **18**: p. 253-285.
124. Grininger, M., Zeth, K., and Oesterhelt, D., *Dodecins: A family of lumichrome binding proteins*. J. Mol. Biol., 2006. **357**(3): p. 842-857.
125. Ellman, G.L., *A colorimetric method for determining low concentrations of mercaptans*. Arch Biochem Biophys, 1958. **74**(2): p. 443-50.
126. Holdgate, G.A., *Making cool drugs hot: isothermal titration calorimetry as a tool to study binding energetics*. Biotechniques, 2001. **31**(1): p. 164-6, 168, 170 passim.
127. Jelesarov, I. and Bosshard, H.R., *Isothermal titration calorimetry and differential scanning calorimetry as complementary tools to investigate the energetics of biomolecular recognition*. J Mol Recognit, 1999. **12**(1): p. 3-18.
128. Pierce, M.M., Raman, C.S., and Nall, B.T., *Isothermal titration calorimetry of protein-protein interactions*. Methods, 1999. **19**(2): p. 213-21.
129. Kelly, S.H.P., N.C., *The use of circular dichroism in the investigation of protein structure and function*. Current Protein and Peptide Science, 2000. **1**: p. 349-384.

130. Holliger, C., Pierik, A.J., Reijerse, E.J., Hagen, W.R., *A spectroelectrochemical study of factor F430 Nickel (II/I) from Methanogenic Bacteria*. J. Am. Chem. Soc, 1992. **115**(13): p. 5651-5656.
131. Atherton, N.M., *Principles of Electron Spin Resonance*. 1993, Chichester: Ellis Horwood LTD.
132. Holtzhauer, M., *Methoden der Proteinanalytik*. 1996, Berlin: Springer-Verlag.
133. Carrington, A., McLachlan, A.D., *Introduction to Magnetic Resonance*. 1969, New York: Harper International Edition.
134. Schleicher, E., Kowalczyk, R.M., Kay, C.W., Hegemann, P., Bacher, A., Fischer, M., Bittl, R., Richter, G., and Weber, S., *On the reaction mechanism of adduct formation in LOV domains of the plant blue-light receptor phototropin*. J Am Chem Soc, 2004. **126**(35): p. 11067-76.
135. Davies, E.R., *A new pulse ENDOR technique*. Phys. Lett. A, 1974. **47**: p. 1-2.
136. Jancarik, J., Kim, S-H. J., *Sparse matrix sampling: a screening method for crystallization of proteins*. J. Appl. Cryst., 1991. **24**: p. 409-411.
137. CCP4, *The CCP4 suite: Programs for protein crystallography*. Acta Crystallogr. Sect. D, 1994. **50**: p. 760-763.
138. Kabsch, W., *Automatic processing of rotation diffraction data from crystals of initially unknown symmetry and cell constants*. J. Appl. Crystallogr., 1993. **26**: p. 795-800.
139. Vagin, A. and Teplyakov, A., *MOLREP: an Automated Program for Molecular Replacement*. J. Appl. Crystallogr., 1997. **30**(6): p. 1022-1025.
140. Murshudov, G.N., Vagin, A.A., and Dodson, E.J., *Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method*. Acta Crystallogr. Sect. D, 1997. **53**(Pt 3): p. 240-255.
141. Emsley, P. and Cowtan, K., *COOT: model-building tools for molecular graphics*. Acta Crystallogr. Sect. D, 2004. **60**: p. 2126-2132.
142. Brunger, A.T., *Free R value: a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures*. Nature, 1992. **355**(6359): p. 472-5.
143. DeLano, W.L. *The PyMOL molecular graphics system*. 2002 [cited.
144. Baker, N.A., Sept, D., Joseph, S., Holst, M.J., and McCammon, J.A., *Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(18): p. 10037-41.
145. Hall, T.A., *BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for window 95/98/NT*. Nucleic Acids Symposium Series, 1999. **41**: p. 95-98.
146. Meißner, B., *Charakterisierung des Dodecins aus Thermus thermophilus - eines neuartigen dodecameren Flavoproteins*, in *Fachbereich Chemie*. 2003, Philipps University: Marburg.
147. Sander, B., *Charakterisierung der Cofaktorbindung an eubakteriellen Dodecinen*, in *Fachbereich Medizin*. 2007, Philipps-Universität: Marburg.
148. Vinzenz, X., *Sphärische Dodecin-Biohybride als Basis für schaltbare Katalysatoren*, in *Fachbereich Chemie*. 2010, Philipps-Universität: Marburg.
149. Munro A.W., K.S.M., Price N.C., *Flavoprotein protocols*. Methods in Molecular Biology, ed. S.K. Chapman, Reid G.A. Vol. 131. 1999, Totowa, NJ: Humana Press Inc. 111-147.
150. Zehnder, A.J. and Wuhrmann, K., *Titanium (III) citrate as a nontoxic oxidation-reduction buffering system for the culture of obligate anaerobes*. Science, 1976. **194**(4270): p. 1165-6.
151. Kaufmann, U., Räuber, A., Schneider, J., *EPR of Ti^{3+} in $CuAlS_2$* . J. Phys. C: Solid State Phys., 1975. **8**: p. L381-L383.

152. Edmondson, D.E., *Electron-spin-resonance studies on flavoenzymes*. Biochem. Soc. Trans., 1985. **13**(3): p. 593-600.
153. Edmondson, D.E. and Tollin, G., *Semiquinone formation in flavo- and metalloflavoproteins*. Top. Curr. Chem., 1983. **108**: p. 109-38.
154. Schweizer, H.P. and Hoang, T.T., *An improved system for gene replacement and xyle fusion analysis in Pseudomonas aeruginosa*. Gene, 1995. **158**(1): p. 15-22.
155. Dunn, N.W. and Holloway, B.W., *Pleiotrophy of p-fluorophenylalanine-resistant and antibiotic hypersensitive mutants of Pseudomonas aeruginosa*. Genet Res, 1971. **18**(2): p. 185-97.
156. Edwards, A.M. and Silva, E., *Effect of visible light on selected enzymes, vitamins and amino acids*. J Photochem Photobiol B, 2001. **63**(1-3): p. 126-31.
157. Rahme, L.G., Ausubel, F.M., Cao, H., Drenkard, E., Goumnerov, B.C., Lau, G.W., Mahajan-Miklos, S., Plotnikova, J., Tan, M.W., Tsongalis, J., Walendziewicz, C.L., and Tompkins, R.G., *Plants and animals share functionally common bacterial virulence factors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(16): p. 8815-21.
158. Ye, R.W., Haas, D., Ka, J.O., Krishnapillai, V., Zimmermann, A., Baird, C., and Tiedje, J.M., *Anaerobic activation of the entire denitrification pathway in Pseudomonas aeruginosa requires Anr, an analog of Fnr*. J Bacteriol, 1995. **177**(12): p. 3606-9.
159. Rahme, L.G., Stevens, E.J., Wolfort, S.F., Shao, J., Tompkins, R.G., and Ausubel, F.M., *Common virulence factors for bacterial pathogenicity in plants and animals*. Science, 1995. **268**(5219): p. 1899-902.
160. Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D.J., *Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs*. Nucleic Acids Res, 1997. **25**(17): p. 3389-402.
161. Finn, R.D., Bateman, A., Clements, J., Coggill, P., Eberhardt, R.Y., Eddy, S.R., Heger, A., Hetherington, K., Holm, L., Mistry, J., Sonnhammer, E.L., Tate, J., and Punta, M., *Pfam: the protein families database*. Nucleic Acids Res, 2014. **42**(Database issue): p. D222-30.
162. Page, R.D., *TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers*. Comput Appl Biosci, 1996. **12**(4): p. 357-8.
163. McWilliam, H., Li, W., Uludag, M., Squizzato, S., Park, Y.M., Buso, N., Cowley, A.P., and Lopez, R., *Analysis Tool Web Services from the EMBL-EBI*. Nucleic Acids Res, 2013. **41**(Web Server issue): p. W597-600.
164. Arockiasamy, A., Aggarwal, A., Savva, C.G., Holzenburg, A., and Sacchettini, J.C., *Crystal structure of calcium dodecin (Rv0379), from Mycobacterium tuberculosis with a unique calcium-binding site*. Protein Sci, 2011. **20**(5): p. 827-33.
165. Schuster-Bockler, B., Schultz, J., and Rahmann, S., *HMM Logos for visualization of protein families*. BMC Bioinformatics, 2004. **5**: p. 7.
166. Grninger, M., *The Function of Halophilic Dodecin*, in *Fakultät für Chemie und Pharmazie*. 2006, Ludwig-Maximilian Universität: München.
167. Meißner, B., Schleicher, E., Weber, S., and Essen, L.O., *The dodecin from Thermus thermophilus, a bifunctional cofactor storage protein*. J Biol Chem, 2007. **282**(45): p. 33142-54.
168. Vinzenz, X., Grosse, W., Linne, U., Meißner, B., and Essen, L.O., *Chemical engineering of Mycobacterium tuberculosis dodecin hybrids*. Chem Commun (Camb), 2011. **47**(39): p. 11071-3.
169. Liu, F., Xiong, J., Kumar, S., Yang, C., Ge, S., Li, S., Xia, N., and Swaminathan, K., *Structural and biophysical characterization of Mycobacterium tuberculosis dodecin Rv1498A*. J Struct Biol, 2011. **175**(1): p. 31-8.

170. Grininger, M., Seiler, F., Zeth, K., and Oesterhelt, D., *Dodecin sequesters FAD in closed conformation from the aqueous solution*. J Mol Biol, 2006. **364**(4): p. 561-6.
171. Grininger, M., Nöll, G., Trawoger, S., Sinner, E.K., and Oesterhelt, D., *Electrochemical switching of the flavoprotein dodecin at gold surfaces modified by flavin-DNA hybrid linkers*. Biointerphases, 2008. **3**(3): p. 51-8.
172. Yu, Y., Heidel, B., Parapugna, T.L., Wenderhold-Reeb, S., Song, B., Schonherr, H., Grininger, M., and Noll, G., *The flavoprotein dodecin as a redox probe for electron transfer through DNA*. Angew Chem Int Ed Engl, 2013. **52**(18): p. 4950-3.
173. Staudt, H., Hoesl, M.G., Dreuw, A., Serdjukow, S., Oesterhelt, D., Budisa, N., Wachtveitl, J., and Grininger, M., *Directed manipulation of a flavoprotein photocycle*. Angew Chem Int Ed Engl, 2013. **52**(32): p. 8463-6.
174. Bernstein, F.C., Koetzle, T.F., Williams, G.J., Meyer, E.F., Jr., Brice, M.D., Rodgers, J.R., Kennard, O., Shimanouchi, T., and Tasumi, M., *The Protein Data Bank: a computer-based archival file for macromolecular structures*. J Mol Biol, 1977. **112**(3): p. 535-42.
175. Murzin, A.G., Brenner, S.E., Hubbard, T., and Chothia, C., *SCOP: a structural classification of proteins database for the investigation of sequences and structures*. J Mol Biol, 1995. **247**(4): p. 536-40.
176. Todone, F., Brick, P., Werner, F., Weinzierl, R.O., and Onesti, S., *Structure of an archaeal homolog of the eukaryotic RNA polymerase II RPB4/RPB7 complex*. Mol Cell, 2001. **8**(5): p. 1137-43.
177. Berkovitch, F., Behshad, E., Tang, K.H., Enns, E.A., Frey, P.A., and Drennan, C.L., *A locking mechanism preventing radical damage in the absence of substrate, as revealed by the x-ray structure of lysine 5,6-aminomutase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(45): p. 15870-5.
178. Eletsky, A., Michalska, K., Houliston, S., Zhang, Q., Daily, M.D., Xu, X., Cui, H., Yee, A., Lemak, A., Wu, B., Garcia, M., Burnet, M.C., Meyer, K.M., Aryal, U.K., Sanchez, O., Ansong, C., Xiao, R., Acton, T.B., Adkins, J.N., Montelione, G.T., Joachimiak, A., Arrowsmith, C.H., Savchenko, A., Szyperski, T., and Cort, J.R., *Structural and functional characterization of DUF1471 domains of Salmonella proteins SrfN, YdgH/SssB, and YahO*. PLoS One, 2014. **9**(7): p. e101787.
179. Anantharaman, V. and Aravind, L., *The SHS2 module is a common structural theme in functionally diverse protein groups, like Rpb7p, FtsA, GyrI, and MTH1598/TM1083 superfamilies*. Proteins, 2004. **56**(4): p. 795-807.
180. van den Ent, F. and Lowe, J., *Crystal structure of the cell division protein FtsA from Thermotoga maritima*. EMBO J, 2000. **19**(20): p. 5300-7.
181. Punta, M.C.P.C.E., R.Y.; Mistry, J; Tate, J; Boursnell, C.; Pang, N.; Forslund, K.; Ceric, G.; Clements, J.; Heger, A.; Holm, L.; Sonnhammer, E.L.L.; Eddy; A. Bateman; R.D. Finn *The Pfam protein families database*, in *Nucleic Acids Research*. 2014. p. D222-30.
182. Holm, L. and Rosenstrom, P., *Dali server: conservation mapping in 3D*. Nucleic Acids Res, 2010. **38**(Web Server issue): p. W545-9.
183. Tiede, C., Tang, A.A., Deacon, S.E., Mandal, U., Nettleship, J.E., Owen, R.L., George, S.E., Harrison, D.J., Owens, R.J., Tomlinson, D.C., and McPherson, M.J., *Adhiron: a stable and versatile peptide display scaffold for molecular recognition applications*. Protein Eng Des Sel, 2014. **27**(5): p. 145-55.
184. Szilagy, A. and Zavodszky, P., *Structural differences between mesophilic, moderately thermophilic and extremely thermophilic protein subunits: results of a comprehensive survey*. Structure, 2000. **8**(5): p. 493-504.

185. Saelensminde, G., Halskau, O., Jr., Helland, R., Willassen, N.P., and Jonassen, I., *Structure-dependent relationships between growth temperature of prokaryotes and the amino acid frequency in their proteins*. Extremophiles, 2007. **11**(4): p. 585-96.
186. Greaves, R.B. and Warwicker, J., *Mechanisms for stabilisation and the maintenance of solubility in proteins from thermophiles*. BMC Struct Biol, 2007. **7**: p. 18.
187. Madern, D., Ebel, C., and Zaccai, G., *Halophilic adaptation of enzymes*. Extremophiles, 2000. **4**(2): p. 91-8.
188. Cuello, A.O., McIntosh, C.M., Rotello V.M., *Model Systems for Flavoenzyme Activity. The Role of N(3)-H Hydrogen Bonding in Flavin Redox Processes*. J. Am. Chem, Soc, 2000. **122**: p. 3517-3521.
189. Bradley, L.H. and Swenson, R.P., *Role of hydrogen bonding interactions to N(3)H of the flavin mononucleotide cofactor in the modulation of the redox potentials of the Clostridium beijerinckii flavodoxin*. Biochemistry, 2001. **40**(30): p. 8686-95.
190. Duurkens, R.H., Tol, M.B., Geertsma, E.R., Permentier, H.P., and Slotboom, D.J., *Flavin binding to the high affinity riboflavin transporter RibU*. J Biol Chem, 2007. **282**(14): p. 10380-6.
191. Sturtevant, J.M. and Tsong, T.Y., *Investigations of yeast L-lactate dehydrogenase (cytochrome b2). VI. Circular dichroism of the holoenzyme*. J Biol Chem, 1969. **244**(18): p. 4942-50.
192. Nishikimi, M. and Kyogoku, Y., *Flavin-protein interaction in egg white flavoprotein*. J Biochem, 1973. **73**(6): p. 1233-42.
193. Nöll, G., Trawoger, S., von Sanden-Flohe, M., Dick, B., and Grininger, M., *Blue-light-triggered photorelease of active chemicals captured by the flavoprotein dodecin*. Chembiochem, 2009. **10**(5): p. 834-7.
194. Wolodko, W.T., Fraser, M.E., James, M.N., and Bridger, W.A., *The crystal structure of succinyl-CoA synthetase from Escherichia coli at 2.5-Angström resolution*. J Biol Chem, 1994. **269**(14): p. 10883-90.
195. Edwards, A.M., *Light-Induced Flavin Toxicity*, in *Flavins-Photochemistry and Photobiology*, P.D. Häder, Jori, G., Editor. 2006, The Royal Society of Chemistry: Cambridge. p. 115-130.
196. Derewenda, Z.S., *Application of protein engineering to enhance crystallizability and improve crystal properties*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2010. **66**(Pt 5): p. 604-15.
197. Smyth, D.R., Mrozkiewicz, M.K., McGrath, W.J., Listwan, P., and Kobe, B., *Crystal structures of fusion proteins with large-affinity tags*. Protein Sci, 2003. **12**(7): p. 1313-22.
198. Costa, S., Almeida, A., Castro, A., and Domingues, L., *Fusion tags for protein solubility, purification and immunogenicity in Escherichia coli: the novel Fh8 system*. Front Microbiol, 2014. **5**: p. 63.
199. Zou, Y., Weis, W.I., and Kobilka, B.K., *N-terminal T4 lysozyme fusion facilitates crystallization of a G protein coupled receptor*. PLoS One, 2012. **7**(10): p. e46039.
200. Thorsen, T.S., Matt, R., Weis, W.I., and Kobilka, B.K., *Modified T4 Lysozyme Fusion Proteins Facilitate G Protein-Coupled Receptor Crystallogenesis*. Structure, 2014. **22**(11): p. 1657-1664.
201. Kreß, D., *Konstruktion hochsymmetrischer Fusionsproteine auf Grundlage der dodecameren Proteine Dodecin und MrgA*, in *Fachbereich Chemie*. 2004, Philipps-Universität: Marburg.
202. Hunte, C. and Michel, H., *Crystallisation of membrane proteins mediated by antibody fragments*. Curr Opin Struct Biol, 2002. **12**(4): p. 503-8.
203. Webert, H., *Konstruktion hochsymmetrischer Membranfusionen*, in *Fachbereich Chemie*. 2006, Philipps-Universität: Marburg.

204. Harrison, P.M. and Arosio, P., *The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation*. Biochim Biophys Acta, 1996. **1275**(3): p. 161-203.
205. Baumeister, W., Walz, J., Zuhl, F., and Seemuller, E., *The proteasome: paradigm of a self-compartmentalizing protease*. Cell, 1998. **92**(3): p. 367-80.
206. Lai, Y.T., Cascio, D., and Yeates, T.O., *Structure of a 16-nm cage designed by using protein oligomers*. Science, 2012. **336**(6085): p. 1129.
207. Padilla, J.E., Colovos, C., and Yeates, T.O., *Nanohedra: using symmetry to design self assembling protein cages, layers, crystals, and filaments*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(5): p. 2217-21.
208. Gradisar, H. and Jerala, R., *Self-assembled bionanostructures: proteins following the lead of DNA nanostructures*. J Nanobiotechnology, 2014. **12**: p. 4.
209. Lanci, C.J., MacDermaid, C.M., Kang, S.G., Acharya, R., North, B., Yang, X., Qiu, X.J., DeGrado, W.F., and Saven, J.G., *Computational design of a protein crystal*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(19): p. 7304-9.
210. McCoy, C.P., Rooney, C., Edwards, C.R., Jones, D.S., and Gorman, S.P., *Light-triggered molecule-scale drug dosing devices*. J Am Chem Soc, 2007. **129**(31): p. 9572-3.
211. Young, D.D. and Deiters, A., *Photochemical activation of protein expression in bacterial cells*. Angew Chem Int Ed Engl, 2007. **46**(23): p. 4290-2.
212. Young, D.D., Edwards, W.F., Lusic, H., Lively, M.O., and Deiters, A., *Light-triggered polymerase chain reaction*. Chem Commun (Camb), 2008(4): p. 462-4.
213. Lemieux, V., Gauthier, S., and Branda, N.R., *Selective and sequential photorelease using molecular switches*. Angew Chem Int Ed Engl, 2006. **45**(41): p. 6820-4.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom April 2003 bis Dezember 2007 und von Mai bis Dezember 2014 unter Betreuung von Herrn Prof. Dr. L.-O. Essen im Fachbereich Chemie der Philipps Universität Marburg angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt daher Herrn Prof. L.-O. Essen für die interessante Aufgabenstellung und das fortwährende Interesse, das er den auftretenden Problemen und unerwarteten Fragestellungen entgegenbrachte. Besonders möchte ich mich bei ihm auch für die Hilfe bei der Lösung der Proteinstrukturen bedanken.

Herrn Prof. Dr. Andreas Heine danke ich für die bereitwillige Übernahme der Zweitkorrektur.

Des weiteren möchte ich mich bei allen jetzigen und ehemaligen Mitgliedern des Arbeitskreises für das entspannte Arbeitsklima und intensiven Diskussionen über Arbeitsmethoden und fragliche Ergebnisse bedanken. Im speziellen danke ich hier Petra Gnau und Anke Morbitzer für die Unterstützung in molekularbiologischen Fragestellungen; Tobias Klar, Stefan Samel, Daniel Kress und Simon Reitz für Hilfe und Diskussionsbereitschaft bei der Strukturaufklärung und dem Bedienen verschiedenster Computerprogramme sowie dafür, dass sie sich zahlreiche Nächte an diversen Synchrotrons um die Ohren geschlagen haben. Bei Claudia Schroeder und Katrin Anders möchte ich mich für das Korrekturlesen dieser Arbeit bedanken.

Mein besonderer Dank gilt auch Bodo Sander für die erfolgreiche Zusammenarbeit und zahlreiche Diskussionen.

Den Vertiefungsstudenten Robin Krüger, Hou Jie, Timm Schlosser, Deborah L. Steffen und Katrin Anders danke ich für die angenehme und erfolgreiche Zusammenarbeit, die durch selbstständiges Durchführen der Arbeiten und Mitdenken oft den Grundstein für viele interessante Ergebnisse gelegt haben.

Des weiteren möchte ich mich bei Dr. Antonio Pierik (ehemals Fachbereich Biologie) für die Aufnahme erster ESR-Spektren und bei Dr. Uwe Linne (Fachbereich Chemie) für die massenspektrometrischen Untersuchungen. Mein Dank gilt außerdem Holger Steuber für die Hilfe bei der Durchführung der ITC-Messungen.

Des weiteren gilt mein Dank unseren Kooperationspartnern:

Prof. Dr. M.-E. Michel-Beyerle und Dr. G. Gurzadyan (TU München) danke ich für die Durchführung der Ultra-Kurzzeit-Spektroskopie und Dr. S. Weber und Dr. E. Schleicher (jetzt Universität Freiburg) danke ich für die EPR Messungen.

Bei Dr. Max Schobert (TU Braunschweig) sowie seinen Mitarbeiterinnen Nelli Bös und Beatrice Benkert möchte ich mich für den angenehmen Aufenthalt in Braunschweig und die Unterstützung bei der Konstruktion der Dodecin Knockout-Mutante und dem Phänotypenscreening bedanken.

Danke sagen möchte ich auch meinem Mann Patrick, der mich während meiner Diplomarbeit und Doktorarbeit immer unterstützt hat, viele Schlachten gegen meinen Computer gewonnen und viele Tränen getrocknet hat. Letzendlich gilt mein Dank natürlich auch meinen Eltern, die mir durch die finanziellen Zuwendungen das finanziell sorgenfreie Studium ermöglicht haben.

